

**Identifizierung von *Cis*- und *Trans*-Faktoren, die beim Imprinting  
der Prader-Willi/Angelman-Syndrom-Region eine Rolle spielen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Biologie und Geographie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Corinna Zogel

aus Mülheim an der Ruhr

Dezember 2007

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

3. Gutachter: /

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. A. Ehrenhofer-Murray

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2008

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

**Zogel C**, Böhringer S, Groß S, Varon R, Buiting K, Horsthemke B (2006) Identification of *cis*- and *trans*-acting factors possibly modifying the risk of epimutations on chromosome 15. Eur J Hum Genet **14**: 752-758.

## Inhaltsverzeichnis

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1       | Genomisches Imprinting .....  | 1         |
| 1.2       | Das Prader-Willi-Syndrom und das Angelman-Syndrom .....                           | 6         |
| 1.2.1     | Molekulargenetische Ursachen des Prader-Willi- und des<br>Angelman-Syndroms ..... | 8         |
| 1.2.2     | Die Gene in der Region 15q11-q13 .....  | 12        |
| 1.2.3     | Mausmodelle für das Prader-Willi- und das Angelman-Syndrom .....                  | 17        |
| 1.3       | Zielsetzung .....   | 19        |
| <b>2.</b> | <b>Material und Methoden</b>  | <b>20</b> |
| 2.1       | Material .....  | 20        |
| 2.1.1     | Chemikalien .....   | 20        |
| 2.1.2     | Standardlösungen .....  | 20        |
| 2.1.3     | Medien .....  | 20        |
| 2.1.3.1   | Medien für die Kultur von Bakterien .....   | 20        |
| 2.1.3.2   | Medien für die Kultur von Hefen .....   | 21        |
| 2.1.3.3   | Medien für die Kultur von Zellen .....  | 22        |
| 2.1.4     | Stämme und Zelllinien .....   | 22        |
| 2.1.4.1   | Bakterienstamm .....  | 22        |
| 2.1.4.2   | Hefestamm .....   | 22        |
| 2.1.4.3   | Zelllinie .....   | 22        |
| 2.1.5     | Plasmide .....  | 22        |
| 2.1.6     | Größenstandards .....   | 23        |
| 2.1.7     | Enzyme .....  | 24        |
| 2.1.8     | Antikörper .....  | 24        |
| 2.1.9     | cDNA .....  | 24        |
| 2.1.10    | Oligonukleotide und Sonden .....  | 24        |
| 2.1.11    | Patienten .....   | 24        |
| 2.2       | Methoden .....  | 25        |
| 2.2.1     | Arbeiten mit DNA .....  | 25        |
| 2.2.1.1   | Isolierung von DNA aus peripherem Blut .....                                      | 25        |
| 2.2.1.2   | Präparation von Plasmid-DNA .....   | 26        |
| 2.2.1.3   | Polymerasekettenreaktion (PCR) .....  | 26        |
| 2.2.1.4   | Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....   | 27        |
| 2.2.1.5   | Auftrennung von DNA in Agarosegelen .....   | 27        |
| 2.2.1.6   | Elution von DNA aus Agarosegelen .....  | 27        |
| 2.2.1.7   | Konzentrationsbestimmung von DNA .....  | 28        |
| 2.2.1.8   | Sequenzierung von DNA .....   | 28        |
| 2.2.1.9   | Restriktionsendonukleaseverdau .....  | 28        |
| 2.2.1.10  | Ligation .....  | 29        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 2.2.1.11  | Bisulfitbehandlung von DNA .....   | 29        |
| 2.2.1.12  | SNaPshot.....  | 29        |
| 2.2.1.13  | TaqMan® SNP Genotyping Assays .....  | 31        |
| 2.2.2     | Bakterien.....   | 32        |
| 2.2.2.1   | Herstellung kompetenter Bakterien .....  | 32        |
| 2.2.2.2   | Transformation kompetenter Bakterien .....   | 32        |
| 2.2.3     | Hefen.....   | 33        |
| 2.2.3.1   | Yeast-Two-Hybrid Screen .....  | 33        |
| 2.2.3.2   | Transformation von Hefezellen .....  | 34        |
| 2.2.3.3   | Gewinnung von Hefeextrakten .....  | 34        |
| 2.2.3.4   | DNA-Präparation aus Hefe .....   | 34        |
| 2.2.4     | Zellkultur.....  | 35        |
| 2.2.4.1   | Kultivierung der Zellen.....   | 35        |
| 2.2.4.2   | Passagieren von Zellen .....   | 35        |
| 2.2.4.3   | Transiente Transfektion von Zellen .....   | 35        |
| 2.2.4.4   | Luciferase-Reportergen Assays .....  | 36        |
| 2.2.5     | Proteine .....   | 36        |
| 2.2.5.1   | <i>In vitro</i> Synthese von Proteinen.....  | 36        |
| 2.2.5.2   | Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) .....  | 36        |
| 2.2.5.3   | Annealing der Oligonukleotide.....   | 37        |
| 2.2.5.4   | Radioaktive Markierung der Oligonukleotide .....   | 38        |
| 2.2.5.5   | Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....                   | 38        |
| 2.2.5.6   | Proteintransfer- und Nachweis.....   | 39        |
| 2.2.6     | Statistische Analyse .....   | 40        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b> .....  | <b>41</b> |
| 3.1       | Identifizierung von <i>Cis</i> -Faktoren, die möglicherweise das Risiko von .....        | 41        |
|           | Epimutationen auf dem Chromosom 15 modifizieren  |           |
| 3.1.1     | Sequenzvarianten im Imprinting Center .....  | 41        |
| 3.1.2     | Analyse der Haplotypstruktur des Imprinting Centers .....                                | 42        |
| 3.1.3     | Die Haplotypen des AS-SRO.....   | 43        |
| 3.1.4     | Die Haplotypen des PWS-SRO.....  | 44        |
| 3.1.5     | Assoziationsstudien der IC Sequenzvarianten .....  | 45        |
| 3.2       | Analyse von indirekten <i>Trans</i> -Faktoren, die möglicherweise das Risiko von .....   | 47        |
|           | Epimutationen auf dem Chromosom 15 modifizieren  |           |
| 3.3       | Identifizierung von Trans-Faktoren, die an den AS-SRO binden.....                        | 48        |
| 3.3.1     | Analyse des Effekts von TIEG1 auf den AS-SRO .....                                       | 50        |
| 3.3.2     | Eingrenzung der Bindestelle von TIEG1 an den AS-SRO .....                                | 54        |
| 3.3.3     | Methylierungsanalyse in Nachkommen von weiblichen <i>Tiegl<sup>-/-</sup></i> Mäusen..... | 57        |
| 3.3.4     | Identifizierung potentieller TIEG1 Bindepartner .....                                    | 59        |
| 3.4       | Methylierungsanalyse der u1B- und u1D-Region .....                                       | 61        |
| 3.4.1     | Methylierungsanalyse der u1B-Region.....   | 63        |
| 3.4.2     | Untersuchung des Methylierungsstatus der u1D-Region .....                                | 65        |
| 3.4.3     | Methylierungsanalyse der u1D- <i>CfoI</i> -Schnittstelle und ihrer Umgebung .....        | 67        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>4.</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>70</b> |
| 4.1       | Identifizierung von <i>Cis</i> - und <i>Trans</i> -Faktoren, die das Risiko für einen ..... Imprinting Defekt erhöhen | 70        |
| 4.1.1     | Der Haplotyp H-AS3 scheint mit einem erhöhten Risiko für einen Imprinting Defekt assoziiert zu sein                   | 70        |
| 4.1.2     | Der <i>MTHFR</i> 677TT Genotyp scheint das Risiko für einen maternalen ..... Imprinting Defekt zu erhöhen             | 72        |
| 4.2       | Spielt TIEG1 eine Rolle beim maternalen Imprinting? .....   | 73        |
| 4.3       | Methylierungsanalyse der Upstream Exons von <i>SNURF-SNRPN</i> .....  | 77        |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>79</b> |
| <b>6.</b> | <b>Literatur</b>  | <b>80</b> |
| <b>7.</b> | <b>Anhang</b>   | <b>94</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                |   |
|----------------|---|
| °C             | Grad Celsius  |
| A              | Adenin  |
| aa             | <i>amino acid</i> ; Aminosäure                          |
| APS            | Ammoniumpersulfat                                       |
| AS             | Angelman-Syndrom  |
| AS-ID          | AS Patient mit einem Imprinting Defekt                  |
| bp             | Basenpaar   |
| BSA            | <i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin        |
| C              | Cytosin   |
| cDNA           | <i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA            |
| Ci             | Curie   |
| CMV            | Cytomegalovirus   |
| CpG            | Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5'-3'-Orientierung |
| cpm            | <i>counts per minute</i> , Impulse pro Minute           |
| del            | Deletion  |
| DMR            | differentiell methylierte Region                        |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure                                  |
| DNase          | Desoxyribonuklease                                      |
| DNMT           | DNA-Methyltransferase                                   |
| dNTP           | 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat                   |
| dsDNA          | Doppelsträngige DNA                                     |
| DTT            | Dithiothreitol  |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                                 |
| EDTA           | Ethylendiamintetraacetat                                |
| EMSA           | <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>             |
| FCS            | <i>Fetal-Calf-Serum</i> ; fötales Kälberserum           |
| G              | Guanin  |
| g              | Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )              |
| g              | Gramm   |
| h              | Stunde  |
| HCl            | Salzsäure   |
| HEPES          | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure    |
| HSV-TK         | Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase                    |
| IC             | Imprinting Center                                       |
| ID             | Imprinting Defekt                                       |
| Imprinting     | Prägung (elternspezifische Genexpression)               |
| invdup 15      | invertierte Duplikation auf dem Chromosom 15            |
| kb             | Kilobasenpaar   |
| kDa            | Kilodalton  |
| KLF            | <i>Krüppel-like Factor</i>                              |
| l              | Liter   |
| <i>lacZ</i>    | β-Galaktosidase Gen                                     |
| M              | mol/l   |
| mat            | maternal  |
| Mb             | Megabasenpaar   |
| meth           | methyliert  |
| MGB            | Minor Groove Binder                                     |
| min            | Minute  |

|          |   |
|----------|---|
| ml       | Milliliter  |
| MS-PCR   | Methylierungsspezifische PCR  |
| mRNA     | <i>messenger</i> RNA; Boten-RNA   |
| NaOH     | Natronlauge   |
| NCBI     | <i>National Center for Biotechnology Information</i> , USA ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ) |
| NP       | Normalperson  |
| OD       | Optische Dichte   |
| ORF      | <i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen  |
| p        | <i>petit</i> ; kurzer Arm eines Chromosoms  |
| P        | Polymorphismus  |
| P        | Patient   |
| <i>P</i> | <i>probability</i> ; Wahrscheinlichkeit   |
| pat      | paternal  |
| PBS      | <i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung   |
| PCR      | <i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion  |
| PEG      | Polyethylenglykol   |
| PWS      | Prader-Willi-Syndrom  |
| PWS-ID   | PWS Patient mit einem Imprinting Defekt   |
| q        | <i>queue</i> ; langer Arm eines Chromosoms  |
| RNA      | Ribonukleinsäure  |
| Rnase    | Ribonuklease  |
| rpm      | <i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute   |
| RT       | Raumtemperatur  |
| SDS      | Sodiumdodecylsulfat   |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese  |
| sec      | Sekunde   |
| snoRNA   | <i>small nucleolar</i> RNA; kleine nukleoläre RNA   |
| SNP      | <i>single nucleotide polymorphism</i> ; Einzelbasenaustausch  |
| SP1      | Specificity Protein 1   |
| SRO      | <i>smallest region of deletion overlap</i> , kleinster überlappender Deletionsbereich   |
| SV40     | Simian Virus 40   |
| T        | Thymin  |
| TAE      | Tris-Acetat-EDTA-Puffer   |
| TBE      | Tris-Borat-EDTA-Puffer  |
| TEMED    | N,N,N',N'-Tetra-methylethylendiamin   |
| Tris     | Tris(hydroxymethyl)aminomethan  |
| U        | Unit  |
| ÜNK      | Übernachtkultur   |
| ü. N.    | über Nacht  |
| unmeth   | unmethyliert  |
| UPD      | uniparentale Disomie  |
| V        | Volt  |
| wt       | Wildtyp   |
| X-Gal    | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid   |



## 1. Einleitung

### 1.1 Genomisches Imprinting

Genomisches Imprinting bzw. genomische Prägung bezeichnet einen epigenetischen Prozess, bei dem bestimmte Chromosomenabschnitte durch die männliche und weibliche Keimbahn spezifisch markiert werden, so dass in somatischen Zellen entweder nur das väterliche oder das mütterliche Allel eines Gens aktiv ist (Reik, 1989; Reik und Walter, 2001). Die beiden elterlichen Genome sind somit funktionell nicht gleichwertig. Transplantationsexperimente von Vorkernen in Mauseizygoten zeigten, dass bei Säugetieren für die normale Embryonalentwicklung sowohl ein väterliches als auch ein mütterliches Genom benötigt wird (Surani *et al.*, 1984; McGrath und Solter, 1984; Barton *et al.*, 1984). Bei einem diploiden maternalen Chromosomensatz (gynogenetisch) wird zwar ein Embryo gebildet, jedoch ist extraembryonales Gewebe kaum vorhanden. Zum umgekehrten Effekt kommt es bei einem diploiden paternalen Chromosomensatz (androgenetisch). Das Trophoblastengewebe wird stark ausgebildet, der Embryo jedoch ist stark retardiert und stirbt einige Tage nach der Implantation. Ähnliche Phänomene gibt es auch beim Menschen. Blasenmole sind Plazentafehlbildungen und haben einen diploiden paternalen Chromosomensatz. Es kommt zu einer bläschenförmigen Entartung der Chorionzotten der Plazenta. Das Trophoblastengewebe ist stark vergrößert, jedoch entwickelt sich kein Embryoblast. Hingegen enthalten benigne Ovarialteratome einen maternalen diploiden Chromosomensatz. In ihnen findet sich Gewebe aller drei Keimblätter, das Plazentagewebe jedoch fehlt (Hall, 1990).

Im Tierreich hat man das Phänomen der genomischen Prägung bisher nur bei Plazentatieren (Eutheria) und Beutelsäugern (Metatheria) gefunden, nicht jedoch bei eierlegenden Säugetieren (Protheria). Die meistdiskutierte Hypothese zur Evolution der genomischen Prägung ist die Geschlechterkonflikthypothese (Moore und Haig, 1991). Sie besagt, dass Imprintingmechanismen entwickelt wurden, um die unterschiedlichen elterlichen Interessen bezüglich der Bereitstellung von maternalen Ressourcen für den Fötus zu regulieren. Väterlich exprimierte Gene tendieren dazu das Embryowachstum auf Kosten der Mutter zu steigern, wohingegen mütterlich exprimierte Gene das Embryowachstum begrenzen, um Ressourcen für weitere Schwangerschaften (eventuell mit anderen Vätern) zu erhalten. In Mäusen z. B. wird der Wachstumsfaktor Igf2 (insulin-like growth factor 2) paternal exprimiert (DeChiara *et al.*, 1991), wohingegen der Wachstumsinhibitor Igf2r (insulin-like

growth factor 2 receptor) maternal exprimiert wird (Barlow *et al.*, 1991). Schätzungsweise unterliegen 100 - 200 der etwa 25.000 Gene des Menschen dem genomischen Imprinting. Bei der Maus sind inzwischen etwa 80 geprägte Gene bekannt, beim Menschen etwa 50 (<http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/research/imprinting/imprin-viewdatagenes.html>; <http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species>).

Eine Besonderheit von geprägten Genen ist, dass sie häufig in Clustern auftreten (Reik und Maher, 1997; Reik und Walter, 2001). Die Expression der Gene in der kompletten geprägten Domäne wird von bestimmten Regulationselementen, den so genannten Imprinting Centern, reguliert. Ein weiteres Merkmal geprägter Gene ist ihr asynchrones Replikationsverhalten. Die beiden elterlichen Allele in geprägten Regionen werden asynchron in der S-Phase des Zellzyklus repliziert, wobei das paternale Allel in der Regel früher repliziert wird als das maternale (Kitsberg *et al.*, 1993; Knoll *et al.*, 1994). Diese asynchrone Replikation ist unabhängig von der Genexpression. Gene, die auf dem gleichen elterlichen Allel liegen werden gleichzeitig repliziert, auch wenn sie von den entgegengesetzten elterlichen Allelen exprimiert werden. Dieses asynchrone Replikationsmuster wird in den Gameten etabliert und während der gesamten Entwicklung aufrechterhalten (Simon *et al.*, 1999).

Uniparentale Disomien (UPD, siehe auch 1.2.1) bei der Maus wiesen auf Chromosomen(abschnitte) hin, die dem genomischen Imprinting unterliegen (Cattanach und Kirk, 1985). Eine UPD liegt vor, wenn zwei homologe Chromosomen denselben elterlichen Ursprung haben. Bei der Maus führen UPDs bestimmter Chromosomenpaare abhängig vom elterlichen Ursprung zu einem auffälligen Phänotyp. Mausembryonen mit einer maternalen UPD 11 sind kleiner als ihre Geschwister aus dem gleichen Wurf, während Mausembryonen mit einer paternalen UPD 11 größer als ihre Geschwister sind.

Auch beim Menschen sind phänotypische Auffälligkeiten für eine maternale UPD 7, 14 und 15 sowie eine paternale UPD 6, 11, 14 und 15 beschrieben worden. Eine paternale UPD 6 ist mit Transientem Neonatalen Diabetes Mellitus (TNDM) assoziiert (Temple *et al.*, 1995; Arima *et al.*, 2001). Eine maternale UPD 7 führt zum Silver-Russel-Syndrom (Kotzot *et al.*, 1995) und eine paternale UPD 11 zum Beckwith-Wiedemann-Syndrom (Henry *et al.*, 1991; Slatter *et al.*, 1994; Weksberg *et al.*, 2003). Bei Patienten mit einer maternalen UPD 14 kommt es zu einer prä- und postnatalen Wachstumsretardierung und einer vorzeitigen Pubertät. Häufig findet man eine muskuläre Hypotonie, eine milde faziale Dysmorphie und eine motorische Entwicklungsverzögerung (Kotzot, 2004). Eine paternale UPD 14 hingegen führt zu einer schweren mentalen Retardierung und Muskel- und Skelettauffälligkeiten

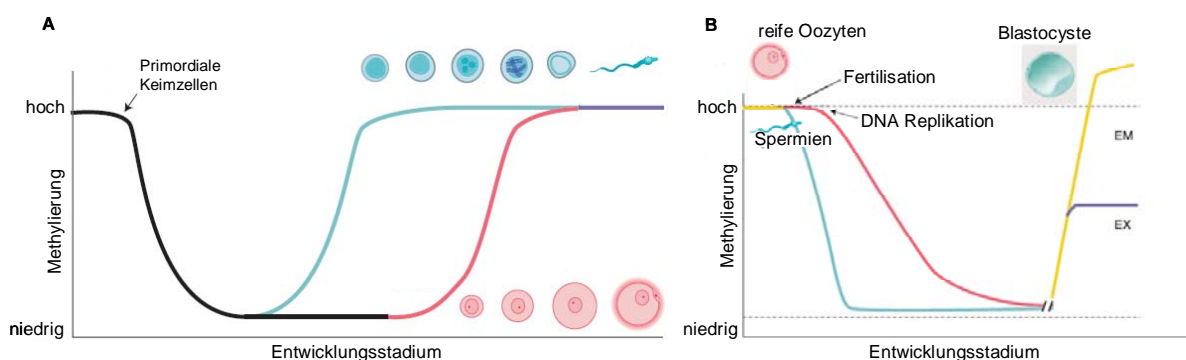
(Cotter *et al.*, 1997; Kurosawa *et al.*, 2002). Eine maternale UPD 15 führt zum Prader-Willi-Syndrom (Nicholls *et al.*, 1989), während eine paternale UPD 15 das Angelman-Syndrom verursacht (Malcolm *et al.*, 1991; Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997).

Geprägte Gene weisen allelspezifische Chromatinmodifikationen auf. Ein Allel liegt in einer euchromatischen, transkriptionell aktiven Konfiguration vor, das andere Allel in einer heterochromatischen, transkriptionell inaktiven. Verursacht werden diese Chromatinunterschiede durch DNA Methylierung an Cytosinen und Histonmodifikationen (hauptsächlich Acetylierungs- und Methylierungsunterschiede an spezifischen Lysinen der Histone H3 und H4).

Die DNA Methylierung scheint eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Expression geprägter Gene zu spielen. Die große Mehrheit geprägter Gene weist Unterschiede in der DNA Methylierung zwischen den elterlichen Allelen in bestimmten Regionen auf, die man als „differentiell methylierte Regionen“ (DMRs) bezeichnet. Bei der DNA Methylierung wird an das 5'-Kohlenstoffatom des Cytosinrestes in Cytosin-Phospho-Guanin-Dinukleotiden (CpGs) eine Methylgruppe angehängt, so dass ein 5-Methylcytosin entsteht. S-Adenosylmethionin dient hierbei als Methylgruppendonor. Die somatischen Genome sind in der Regel global methyliert. Eine Ausnahme bilden CpG-Inseln im 5'-Bereich von Haushaltsgenen und einigen gewebsspezifischen Genen. Diese sind typischerweise unmethyliert. Die ursprüngliche Definition für eine CpG-Insel stammt von Gardiner-Garden und Frommer (1987) und definiert CpG-Inseln als Bereiche, die mindestens 200 bp groß sind, deren GC Gehalt mindestens 50% ist und der Quotient der beobachteten CpGs im Vergleich zu den erwarteten CpGs ( $\text{CpG}_{\text{obs}}/\text{CpG}_{\text{exp}}$ ) über 0,6 liegt. Mittlerweile gibt es aber stringendere Definitionen. Takai und Jones (2002) z. B. schlagen Kriterien von 500 bp, einen GC Gehalt von mindestens 55% und  $\text{CpG}_{\text{obs}}/\text{CpG}_{\text{exp}}$  von mindestens 0,65 vor. Mit dieser Definition kann man ausschließen, dass die Mehrzahl der *Alu* Repeats, die einen hohen GC Gehalt und ein hohes  $\text{CpG}_{\text{obs}}/\text{CpG}_{\text{exp}}$  Verhältnis haben, mit erfasst wird.

Die Methylierungsmuster in somatischen Zellen sind in der Regel stabil und werden bei der Zellteilung weitervererbt. Im Gegensatz dazu finden während der Keimzell- und der Embryonalentwicklung dramatische Änderungen des DNA-Methylierungsmusters statt (Abb. 1.1) In den primordialen Keimzellen, die zunächst hochmethyliert sind, kommt es zu einer globalen Demethylierung, wodurch am Tag 10,5 – 11,5 in der Embryonalphase der Maus die elterliche Prägung ausgeradiert wird. Ob die Demethylierung aktiv oder passiv erfolgt ist nicht bekannt. Während der Oogenese und der Spermatogenese erfolgt dann eine *de novo*

Methylierung, wobei auch die DNA-Methylierungs-Imprints etabliert werden. Bei den geprägten Genen erfolgt die DNA Methylierung durch die *de novo* Methyltransferase Dnmt3a und dem assoziierten Protein Dnmt3L (Bourc'his *et al.*, 2001; Kaneda *et al.*, 2004). Dnmt3L selbst besitzt keine Enzymaktivität, ist aber notwendig für die Etablierung von Methylierungsmustern in der weiblichen Keimbahn (Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002). Schon kurz nach der Fertilisation findet eine erneute Demethylierung statt, wobei die Methylierungs-Imprints geprägter Gene jedoch bestehen bleiben. Das paternale Genom wird aktiv demethyliert (Mayer *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 2000), wobei der zugrunde liegende Mechanismus bzw. die zugrunde liegende enzymatische Aktivität bisher nicht bekannt ist. Das maternale Genom wird ab dem Zweizellstadium durch einen replikationsabhängigen Mechanismus graduell passiv demethyliert (Howlett und Reik, 1991; Rougier *et al.*, 1998). Mit jeder Zellteilung geht die Hälfte der Methylierung verloren, da die Methyltransferase Dnmt1, die für die Aufrechterhaltung der Methylierung zuständig ist, aus dem Nukleus ausgeschlossen ist (Carlson *et al.*, 1992). Im 16-32-Zellstadium sind paternales und maternales Genom gleichermaßen und maximal demethyliert. Im Blastozystenstadium der Maus findet dann eine *de novo* Methylierung der nicht geprägten Gene durch die Methyltransferasen Dnmt3a und Dnmt3b statt. Der Umfang der Methylierung unterscheidet sich jedoch bei den verschiedenen Zellentwicklungslinien. Die embryonalen Zelllinien werden stärker methyliert als die extraembryonalen. Während der Embryoentwicklung wird die Methylierung der geprägten Gene im 8-Zell-Stadium durch die Methyltransferase Dnmt1o (die Oozyten-spezifische Form von Dnmt1) (Howell *et al.*, 2001) und danach durch die Methyltransferase Dnmt1 (Li *et al.*, 1993) aufrechterhalten.



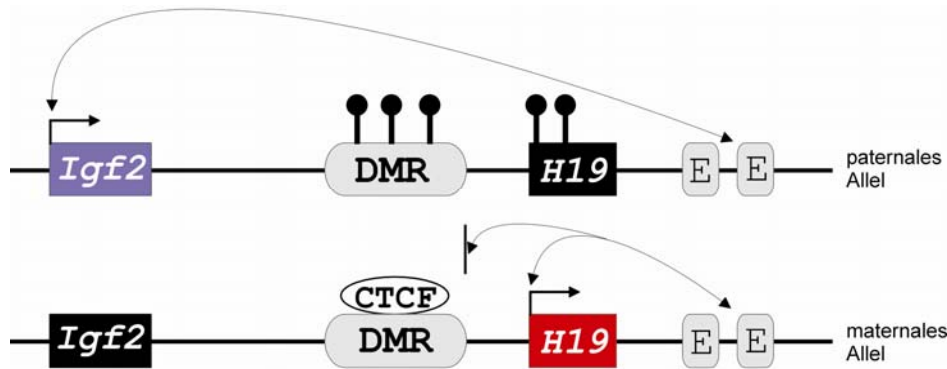
**Abb. 1.1:** Reprogrammierung der Methylierungsmuster in der Keimbahn (A) und im Embryo (B). Blau, paternales Genom; rot, maternales Genom; gestrichelte Linie, geprägte Gene; EM, embryonales Gewebe; EX, extraembryonales Gewebe (modifiziert aus Reik *et al.*, 2001).

Neben der DNA Methylierung spielen auch andere Faktoren, wie Histonmodifikationen, eine Rolle bei der Expression geprägter Gene. Die wichtigsten Modifikationen sind Methylierung und Acetylierung der Histone H3 und H4. So ist z. B. die Methylierung von Lysin 4 im Histon 3 (H3K4) mit einer aktiven Genexpression assoziiert, während die Methylierung von H3K9, H3K27 und H4K20 mit einer Repression assoziiert ist. Eine Acetylierung von H3K9 ist mit einer Aktivierung der Genexpression assoziiert (Jenuwein und Allis, 2001; Kouzarides, 2007).

Die Prozesse der DNA Methylierung und Histonmodifikation sind jedoch eng miteinander verbunden. Es gibt verschiedene Methyl-CpG-bindende Proteine (MECPs), die spezifisch an methylierte CpGs binden und eine Repression der Genexpression bewirken. Bisher sind sechs solcher Proteine identifiziert worden: MECP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 und Kaiso. MECP2 z. B. bildet einen Komplex mit Histondeacetylasen und Sin3A, einem Co-Repressor-Protein (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998). Durch die Deacetylierung der Histone kommt es zu einer geschlossenen Chromatinstruktur und der Repression der Transkription. MECP2 ist aber auch mit einer Histon-Methylierung assoziiert. Für das Gen *H19* konnte gezeigt werden, dass das Entfernen der Acetylgruppe des Lysin 9 im Histon 3 (H3K9) zu einer Methylierung von H3K9 führt (Fuks *et al.*, 2003). Diese Methylierung wiederum ist ein Signal für die Rekrutierung von Proteinen wie HP1 (heterochromatin protein 1), die eine Komprimierung des Chromatins bewirken und somit eine Repression der Expression (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001).

Viel häufiger aber wird durch DNA Methylierung die Bindung von Proteinen verhindert. CTCF (CCCTC-binding factor), ein 11-Zink-Finger Protein, ist ein wichtiger Regulator geprägter Genexpression. CTCF ist ein Chromatin Isolator, der das Genom in unabhängige funktionelle Domänen teilt, oder im Falle von geprägten Regionen, den Zugang von entfernten Enhancern zu Promotern reguliert. CTCF bindet nur an das unmethylierte Allel, wodurch Gene, die durch ein Imprinting Center (IC) reguliert werden, in einer allelspezifischen Weise exprimiert werden (Kanduri *et al.*, 2000; Klenova *et al.*, 2002). Dies konnte für die Gene *H19* und *Igf2* gezeigt werden (Abb. 1.2). Das IC liegt zwischen den beiden reziprok exprimierten Genen. Es ist differentiell methyliert und kontrolliert den Zugang von zwei Enhancer Elementen, die downstream von *H19* liegen und von beiden Genen genutzt werden. Das maternale IC ist unmethyliert, so dass das Protein CTCF binden kann. Es fungiert als Isolator, der die Wechselwirkung zwischen den beiden Enhancern und dem *Igf2* Promoter verhindert, aber die Wechselwirkung mit dem *H19* Promoter zulässt, wodurch es zur Expression von *H19* kommt. Auf dem paternalen Chromosom verhindert die

DNA Methylierung die Bindung des Proteins CTCF, so dass der Enhancer mit dem *Igf2* Promoter interagieren kann und *Igf2* exprimiert wird (Hark *et al.*, 2000; Ohlsson *et al.*, 2001; Szabo *et al.*, 2004).



**Abb. 1.2:** Das CTCF Isolator Model für den *Igf2/H19* Locus. Blaue Box, paternal exprimiertes Gen; rote Box, maternal exprimiertes Gen; schwarze Boxen, stillgelegte Gene; die Pfeile an den Boxen geben die Transkriptionsrichtung an; DMR, differentiell methylierte Region; E, Enhancer; schwarz ausgefüllte Kreissymbole, Methylierung (modifiziert aus Wood und Oakey, 2006).

## 1.2 Das Prader-Willi-Syndrom und das Angelman-Syndrom

Das Prader-Willi-Syndrom (PWS) und das Angelman-Syndrom (AS) sind zwei distinkte neurogenetische Erkrankungen, die durch den Funktionsverlust geprägter Gene in der chromosomalen Region 15q11-q13 verursacht werden. Das Prader-Willi-Syndrom tritt mit einer Inzidenz von 1/15.000 auf und wurde erstmalig 1956 von A. Prader, A. Labhard und H. Willi beschrieben (Prader *et al.*, 1956). Patienten mit PWS zeigen im Neugeborenenalter eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie, wodurch es zu Fütterungsproblemen und einer verzögerten Entwicklung kommt. Im Alter von zwei bis drei Jahren entwickeln sie jedoch eine Hyperphagie und eine Adipositas. Weitere Merkmale sind ein Hypogonadismus, Kleinwuchs, kleine Hände und Füße und ein typisches Gesicht mit mandelförmigen Augen, einem dreieckigen Mund und einer schmalen Stirn (Abb. 1.3). Des Weiteren haben Patienten mit PWS eine meist moderate mentale Retardierung und zeigen Verhaltensauffälligkeiten, wie z. B. häufige Wutanfälle. Aufgrund der Symptomatik wird eine Störung im Hypothalamus vermutet, ein Teil des Zwischenhirns, der wichtige Regulationsvorgänge, wie Wach- und Schlafrythmus, Körpertemperatur, Sexual- und Fortpflanzungsverhalten, Nahrungsaufnahme und Fettstoffwechsel koordiniert. Bei einigen Patienten mit PWS wurde eine verminderte Wachstumshormonausschüttung festgestellt (Lee *et al.*, 1987; Angulo *et al.*, 1992; Ritzen *et al.*, 1992). Durch Behandlung mit Wachstumshormonen kam es nicht nur zu einer Steigerung

der Wachstumsrate, sondern auch zu einer Umwandlung von Körperfett zu Muskelmasse, bedingt durch die anabole Wirkung des Hormons (Angulo *et al.*, 1992; Kamel *et al.*, 1995; Eiholzer *et al.*, 2000; Tauber *et al.*, 2000).

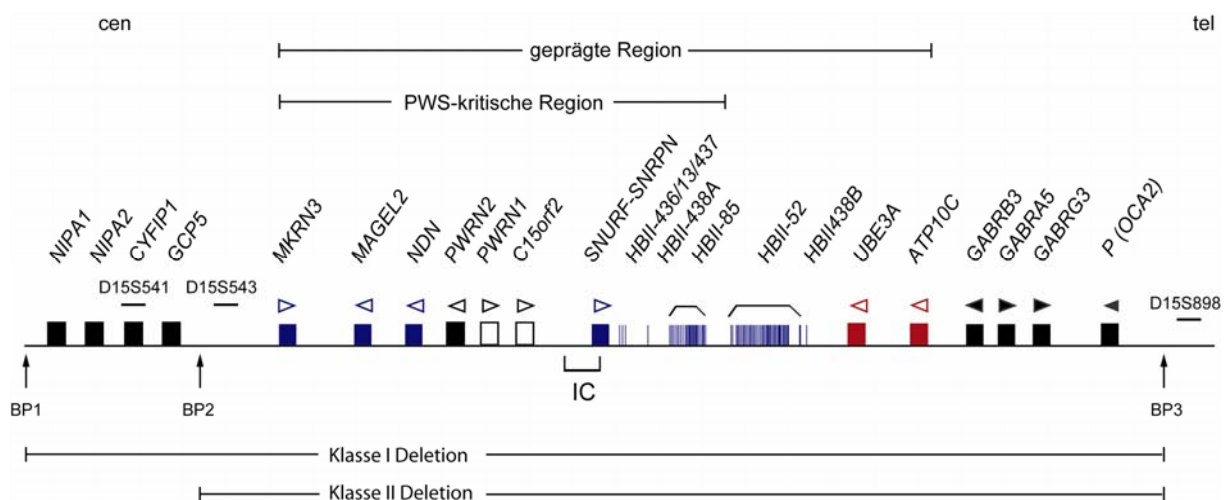
Das Angelman-Syndrom wurde das erste Mal 1965 durch den englischen Kinderarzt H. Angelman beschrieben (Angelman, 1965) und tritt mit einer Häufigkeit von 1/20.000 auf. Patienten mit Angelman-Syndrom haben eine deutlich verzögerte Entwicklung einschließlich einer Ataxie und einer schweren mentalen Retardierung. Sie entwickeln in der Regel keine aktive Sprache. Weitere Symptome sind eine Mikrozephalie, spezifische Elektroenzephalogramm (EEG) Veränderungen und Krampfanfälle (Williams *et al.*, 1995). Charakteristisch sind ferner häufige Lachanfalle und ein ausgeprägt freundliches Verhalten, weshalb das Syndrom zusammen mit dem durch Ataxie geprägtem Bewegungsmuster früher auch als „happy puppet syndrome“ bezeichnet wurde (Bower und Jeavons, 1967).



**Abb. 1.3:** Patientin mit einem Prader-Willi-Syndrom (links) und Patient mit einem Angelman-Syndrom (rechts)

### 1.2.1 Molekulargenetische Ursachen des Prader-Willi- und des Angelman-Syndroms

Das Prader-Willi- und das Angelman-Syndrom werden durch einen Funktionsverlust von geprägten Genen in der chromosomalen Region 15q11-q13 verursacht (Abb. 1.4). Es gibt keine Patienten mit PWS, die einen Einzelgendedefekt aufweisen. Es wird daher vermutet, dass das Prader-Willi-Syndrom durch Verlust oder Inaktivierung mehrerer paternal exprimierter Gene entsteht (contiguous gene syndrome) (Nicholls *et al.*, 1998). Das Angelman-Syndrom wird durch den Funktionsverlust der maternalen Kopie des *UBE3A*-Gens verursacht.



**Abb. 1.4:** Schematischer Überblick der chromosomalen Region 15q11-q13. Paternal exprimierte Gene sind als blaue Boxen und snoRNA-Gene als blaue Striche dargestellt. Maternal exprimierte Gene sind rot und biallelisch exprimierte Gene sind schwarz dargestellt. Gene, die monoallelisch exprimiert werden, bei denen aber unklar ist ob sie paternal oder maternal exprimiert werden, sind durch weiße Boxen dargestellt. Die Transkriptionsrichtung wird durch Pfeile oberhalb der Gene angezeigt. BP, Bruchpunkt; IC, Imprinting Center; cen, Centromer; tel, Telomer. Nicht maßstabsgetreu.

Interstitielle *de novo* Deletionen der Region 15q11-q13 sind die häufigste Ursache für PWS oder AS und treten in 70% der Fälle auf. Bei beiden Syndromen ist die gleiche Region betroffen, aber bei PWS liegt die Deletion immer auf dem paternalen Chromosom (Butler und Palmer, 1983; Knoll *et al.*, 1989) wohingegen bei AS die Deletion immer das maternale Chromosom betrifft (Knoll *et al.*, 1989). Bei einer paternalen Deletion kommt es somit zu einem Funktionsverlust der paternal exprimierten Gene, bei einer maternalen Deletion zum Funktionsverlust der maternal exprimierten Gene. Die Deletionen umfassen ungefähr 5 – 6 Mb und schließen sowohl die geprägten Gene als auch mehrere Gene, die nicht dem Imprinting unterliegen mit ein. Sie sind nur durch eine hochauflösende Chromosomenanalyse sichtbar und wurden erstmalig 1981 von Ledbetter *et al.* bei Patienten mit PWS beschrieben.



In der Regel werden zwei verschiedene Klassen von Deletionen unterschieden, Klasse I und Klasse II Deletionen. Die Deletionsbruchpunkte liegen geclustert vor. Bei beiden Klassen liegen die distalen Bruchpunkte zwischen dem *P* Gen und dem Marker *D15S898* (Bruchpunkt Region 3). Bei Klasse I Deletionen, die 30 – 40% der Patienten betreffen, liegt der proximale Bruchpunkt centromerisch des Markers *D15S541* (Bruchpunkt Region 1). Bei Klasse II Deletionen (60 – 70% der Patienten) befindet sich der proximale Bruchpunkt centromerisch des Markers *D15S543* (Bruchpunkt Region 2) (Knoll *et al.*, 1990; Kuwano *et al.*, 1992; Mutirangura *et al.*, 1993; Christian *et al.*, 1995; Christian *et al.*, 1999; Chai *et al.*, 2003). Die Bruchpunkte liegen in duplizierten Sequenzabschnitten. Diese können zu ungleichen Crossing-Over zwischen zwei homologen Chromosomen 15 (interchromosomal) oder zwischen verschiedenen Regionen eines Chromosom 15 (intrachromosomal) während der Meiose führen, wodurch es zu den typischen Deletionen kommt (Buiting *et al.*, 1992; Buiting *et al.*, 1998a; Amos-Landgraf *et al.*, 1999; Christian *et al.*, 1999; Ji *et al.*, 1999). Das Wiederholungsrisiko ist sehr gering, wenn bei den Eltern keine Chromosomenstörung vorliegt.

Eine weitere molekulargenetische Ursache für PWS und AS ist eine uniparentale Disomie (UPD), das heißt die Patienten haben zwei Chromosomen 15 gleicher elterlicher Herkunft (Nicholls *et al.*, 1989; Malcolm *et al.*, 1991). Bei 25 – 30% der Patienten mit PWS findet man eine maternale Disomie 15, wodurch es zum Funktionsverlust paternal exprimierter Gene kommt. Jedoch liegt nur bei 1–3% der Patienten mit AS eine paternale Disomie vor. Dadurch kommt es zum Funktionsverlust maternal exprimierter Gene. Der erste Nachweis einer maternalen Disomie erfolgte 1989 durch Nicholls *et al.*, eine paternale Disomie wurde erstmals 1991 von Malcolm *et al.* nachgewiesen. Eine UPD entsteht durch Fehler während der Meiose (Engel, 1993). Durch eine Fehlverteilung der homologen Chromosomen 15 während der weiblichen Meiose I oder Fehlverteilung der zwei Schwesterchromatiden während der Meiose II kommt es zu einer disomen Oozyte und einer nullisomen Oozyte. Bei der Befruchtung der disomen Oozyte kommt es zu einer trisomen Zygote. Da dies mit einer normalen Entwicklung nicht vereinbar ist, kann es zu einem Korrekturvorgang, dem „Trisomie-Rescue“ kommen, wobei eins der Chromosomen verloren geht. In zwei Dritteln der Fälle geht ein maternales Chromosom verloren, was zu einem normalen Chromosomensatz führt. In einem Drittel der Fälle geht jedoch das paternale Chromosom verloren, wodurch es zu einer maternalen UPD kommt. Fand die Fehlverteilung in der Meiose I statt, kommt es zu einer Heterodisomie, fand die Fehlverteilung in der Meiose II statt, liegt

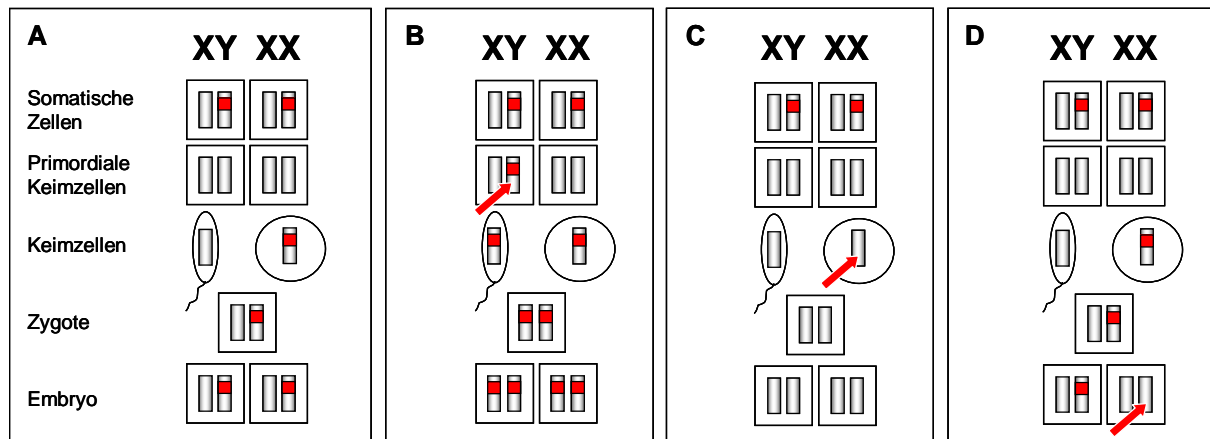
eine Isodisomie vor. Zu einer Isodisomie kommt es auch bei der Befruchtung der nullisomen Oozyte mit einem normalen Spermium. Es entsteht eine monosome Zygote, in der die Monosomie in der frühen Mitose durch eine Duplikation des paternalen Chromosoms ausgeglichen werden kann. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Monosomie-Rescue“. Durch Rekombinationsereignisse vor der Chromosomensegregation besteht das Chromosom aus isodisomen und heterodisomen Abschnitten. Das Risiko für eine UPD nimmt mit steigendem Alter der Mutter zu (Mascari *et al.*, 1992; Robinson, 2000).

Eine kleine Gruppe der Patienten (ca. 1% bei PWS und 4% bei AS) hat einen Imprinting Defekt (ID). Das heißt, die Patienten haben scheinbar normale Chromosomen 15 biparentaler Herkunft, jedoch trägt bei Patienten mit PWS das paternale Chromosom eine maternale Prägung, während bei Patienten mit AS das maternale Chromosom eine paternale Prägung aufweist. Dadurch kommt es zu einem Funktionsverlust der paternal bzw. maternal exprimierten Gene.

In etwa 10% der Patienten mit AS und einem Imprinting Defekt und 15% der Patienten mit PWS und einem Imprinting Defekt ist der Fehler auf eine Mikrodeletion im Imprinting Center (IC) zurückzuführen (sekundäre Epimutation) (Sutcliffe *et al.*, 1994; Buiting *et al.*, 1995; Saitoh *et al.*, 1996; Ohta *et al.*, 1999a; Ohta *et al.*, 1999b; Buiting *et al.*, 2000). Das IC hat eine zweigeteilte Struktur und besteht aus zwei kritischen Elementen, dem AS-SRO und dem PWS-SRO. Der PWS-SRO ist der kleinste überlappende Deletionsbereich (SRO: „smallest region of deletion overlap“) und wurde in PWS Patienten mit ID und IC-Deletionen identifiziert. Der PWS-SRO umfasst 4,1 kb (Ohta *et al.*, 1999a; Driscoll and Hui-Jia Dong, persönliche Mitteilung) und überlappt mit dem *SNURF-SNRPN* Promoter und Exon 1. Umgekehrt haben IC-Deletionen bei AS Patienten zur Identifizierung des AS-SRO geführt. Er umfasst 880 bp (Buiting *et al.*, 1999) und liegt 30 kb upstream des PWS-SRO. Das IC reguliert in *cis* die DNA Methylierung, die Genexpression und die Chromatinstruktur der geprägten Region 15q11-q13. Der PWS-SRO wird für die post-zygotische Aufrechterhaltung des väterlichen Imprints im frühen Embryo benötigt (Bielinska *et al.*, 2000; El-Maarri *et al.*, 2001). Deletionen des PWS-SRO haben keinen Effekt, wenn sie durch die weibliche Keimbahn transmittiert werden, führen aber zu einem maternalen Imprint auf dem paternalen Chromosom, wenn sie vom Vater vererbt werden (Bielinska *et al.*, 2000; El-Maarri *et al.*, 2001). Der AS-SRO interagiert möglicherweise mit dem PWS-SRO, um den mütterlichen Imprint in der weiblichen Keimbahn zu etablieren (Buiting *et al.*, 1995; Dittrich *et al.*, 1996; Shemer *et al.*, 2000; Perk *et al.*, 2002; Kantor *et al.*, 2004a; Kantor *et al.*, 2004b). IC-

Deletionen sind in ca. 50% der Fälle familiär. In einigen Fällen ist die Deletion aber entweder *de novo* oder als Konsequenz eines Keimbahnmosaiks entstanden (Buiting *et al.*, 2003). Bei familiären IC-Deletionen besteht ein 50%iges Wiederholungsrisiko. Bei AS Patienten mit einem Imprinting Defekt und einer IC-Deletion ist immer nur der AS-SRO deletiert. Bei einigen PWS Patienten mit einem Imprinting Defekt und einer IC-Deletion, ist nicht nur der PWS-SRO deletiert, sondern zusätzlich auch der AS-SRO (Buiting *et al.*, 1995; Schuffenhauer *et al.*, 1996; Ohta *et al.*, 1999a; Bielinska *et al.*, 2000).

Bei der Mehrheit der Patienten mit einem Imprinting Defekt (85% - 90%), sind die Defekte jedoch Epimutationen, die in Abwesenheit von DNA Sequenzänderungen auftreten (primäre Epimutation) (Buiting *et al.*, 2003). Bei PWS ist das Chromosom 15, das bei den Patienten den Imprinting Defekt trägt, immer von der väterlichen Großmutter (Buiting *et al.*, 2003) ererbt. Das weist darauf hin, dass der großmütterliche Imprint in der väterlichen Keimbahn nicht ausradiert und somit weitervererbt wird (Abb. 1.5B). Im Gegensatz dazu ist bei AS das Chromosom 15, das bei den Patienten den Imprinting Defekt trägt, sowohl von dem mütterlichen Großvater als auch von der mütterlichen Großmutter ererbt. Das weist darauf hin, dass der Imprinting Defekt nach der Ausradierung des elterlichen Imprints auftritt, d. h. er resultiert aus einem Fehler bei der Etablierung des Imprints (Abb. 1.5C) oder der Aufrechterhaltung des Imprints (Abb. 1.5D). Im Gegensatz zu Patienten mit einer IC-Deletion haben einige dieser Patienten das gleiche Chromosom wie ein gesundes Geschwisterkind ererbt. Das Wiederholungsrisiko für ein weiteres Kind mit AS oder PWS ist somit sehr gering. Ungefähr ein Drittel der Patienten mit AS und einer primären Epimutation hat ein somatisches Mosaik, d. h. die Patienten haben eine normale Zelllinie und eine Zelllinie mit einem Imprinting Defekt (Nazlican *et al.*, 2004). Zu einem somatischen Mosaik kommt es vermutlich durch Fehler bei der Aufrechterhaltung des Imprints. Somatische Mosaik bei Patienten mit PWS sind sehr selten.



**Abb. 1.5:** Genomisches Imprinting und Imprinting Defekte. Zur Vereinfachung sind nur ein Chromosomenpaar und der maternale Methylierungs imprint (roter Streifen) dargestellt. (A) In somatischen Zellen trägt das maternale Chromosom einen maternalen Imprint. Dieser wird in den primordialen Keimzellen ausradiert, in den Oozyten neu etabliert und in der Zygote und im Embryo aufrechterhalten. Imprinting Fehler (durch rote Pfeile markiert) können durch Fehler beim Auslöschen (B), bei der Etablierung (C) oder bei der Aufrechterhaltung (D) des Imprints entstehen.

Etwa 5 - 10% der Patienten mit AS haben auf dem mütterlichen Chromosom eine Mutation im *UBE3A*-Gen (Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997). Nahezu alle Mutationen führen zu einem vorzeitigen Stop-Codon und somit zu einem Funktionsverlust. Familiäre *UBE3A* Mutationen sind mit einem 50%igem Wiederholungsrisiko assoziiert.

Bei ungefähr 15 - 20% der Patienten mit AS ist der molekulargenetische Defekt ungeklärt.

Bei sechs Patienten mit PWS-Merkmalen wurde eine balancierte Translokation nachgewiesen, bei dem ein Translokationsbruchpunkt im *SNURF-SNRPN* Transkript liegt (Schulze *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996; Conroy *et al.*, 1997; Kuslich *et al.*, 1999; Wirth *et al.*, 2001; Schüle *et al.*, 2005).

### 1.2.2 Die Gene in der Region 15q11-q13

Die verantwortlichen Gene für PWS und AS liegen eng benachbart in der chromosomalen Region 15q11-q13 und unterliegen dem genomischen Imprinting. In der geprägten Region liegen mehrere Gene, die nur vom väterlichen Chromosom exprimiert werden, dieses sind *MAKORIN3* (*MKRN3*), *MAGEL2*, *NECDIN* (*NDN*), *SNURF-SNRPN* und mehr als 70 Gene, die für kleine nukleoläre RNAs (snoRNAs) kodieren.

Am weitesten proximal gelegen ist das intronlose Gen *MKRN3*. Es wird ubiquitär exprimiert und kodiert für ein Polypeptid mit einem RING Zink-Finger und drei C<sub>3</sub>H Zink-Finger Motiven, die auf eine Funktion als Ribonukleoprotein hinweisen (Jong *et al.*, 1999).

Weiter distal liegen die ebenfalls intronlosen Gene *MAGEL2* (*melanoma-associated antigen-like 2*) und *NDN*. Beide Gene kodieren Proteine, die zur Gruppe der MAGE (melanoma-associated antigen) Protein Familie gehören. *MAGEL2* ist 160 kb distal von *MKRN3* lokalisiert und wird hauptsächlich im Gehirn und in verschiedenen fetalen Geweben exprimiert (Boccaccio *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000).

*NDN* liegt 41 kb distal von *MAGEL2* und wird beim Menschen in allen bisher untersuchten Geweben exprimiert, mit der höchsten Expression im Gehirn und der Plazenta (MacDonald und Wevrick, 1997; Jay *et al.*, 1997). In Mäusen wird *Ndn* hauptsächlich in postmitotischen Neuronen exprimiert, mit der höchsten Expression im Hypothalamus und anderen Hirnregionen im späten Embryostadium und im frühen postnatalen Stadium (Uetsuki *et al.*, 1996; Gerard *et al.*, 1999; Muscatelli *et al.*, 2000).

Der komplexeste Locus ist *SNURF-SNRPN*. *SNRPN* (*small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*) wurde 1992 von Özcelik *et al.* in die chromosomale Region 15q11-q13 kartiert. Das ursprünglich beschriebene Gen bestand aus 10 Exons, die für zwei unterschiedliche Proteine kodieren (Gray *et al.*, 1999a). Die Exons 1 – 3 kodieren für SNURF (SNRPN upstream reading frame), ein aus 71 basischen Aminosäuren bestehendes kleines Polypeptid, das im Nukleus lokalisiert ist. Seine Funktion ist bisher noch unbekannt. Die Exons 4 – 10 kodieren für das aus 240 Aminosäuren bestehende Protein SmN. Es ist Teil des spleißosomen Komplexes und spielt eine Rolle beim Spleißen von RNA im Gehirn, wo es das SmB'/B-Protein ersetzt (Gray *et al.*, 1999b).

In den letzten Jahren wurden alternative Transkripte mit vielen weiteren 5'- und 3'-Exons für *SNURF-SNRPN* gefunden. Sie kodieren nicht für Proteine und kommen in vielen verschiedenen Spleißformen des primären Transkriptes vor. Alternative Transkripte, die neue 5'-Exons enthalten und alle auf Exon 2 von *SNURF-SNRPN* gespleißt werden, wurden von Dittrich *et al.* (1996) und Färber *et al.* (1999) beschrieben. Für diese alternativen Transkripte konnten zwei unterschiedliche Startpositionen nachgewiesen werden, u1A und u1B. U1A und u1B weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit zueinander und zu einer weiteren verwandten Sequenz auf. Diese Sequenz, u1D, liegt etwa 63 kb proximal von u1B und besitzt eine konservierte Spleißstelle, jedoch konnte bisher keine Expression von u1D nachgewiesen werden. Methylierungsanalysen mittels Southern-Blot zeigten, dass die u1A- und u1B-Region auf dem maternalen Chromosom methyliert und auf dem paternalen Chromosom unmethyliert sind.

Die Transkripte werden ausschließlich vom paternalen, unmethyliertem Allel exprimiert. Der Methylierungsstatus von u1D ist bisher nicht untersucht worden. Es gibt jedoch ca. 3,3 kb proximal von u1D eine *CfoI*-Restriktionsschnittstelle, die elternspezifisch methyliert vorliegt. Im Gegensatz zu allen anderen differentiell methylierten Regionen in 15q11-q13 ist diese Stelle auf dem paternalen Chromosom hypermethyliert und auf dem maternalen Chromosom hypomethyliert (Färber *et al.*, 1999).

In den letzten Jahren wurden ebenfalls alternativ gespleißte Transkripte identifiziert, die neue 3'-Exons enthalten (Buiting *et al.*, 1997; Runte *et al.*, 2001; Wirth *et al.*, 2001). Sie überspannen einen genomischen Bereich von mehr als 460 kb und überlappen in Antisense-Orientierung mit dem *UBE3A*-Gen. Die *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit dient somit als Startpunkt für ein *UBE3A* Antisense Transkript, das sowohl beim Menschen als auch in der Maus nachgewiesen werden konnte (Rougeulle *et al.*, 1998; Chamberlain und Brannan, 2001). Auch die *IPW*-Exons sind Bestandteil dieses komplexen *SNURF-SNRPN* Sense/*UBE3A* Antisense Transkripts und repräsentieren nicht, wie vorher vermutet, ein unabhängiges nicht kodierendes Gen (Wevrick *et al.*, 1994).

Interessanterweise dient die *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit auch als Wirtsgen für kleine, nukleoläre RNAs (small nucleolar RNAs, snoRNAs), die in den Introns der Transkriptionseinheit liegen. Sie kommen als Einzelkopie-Gene (*HBII-13*, *HBII-436*, *HBII-437*, *HBII-438A* und *HBII-438B*) oder als Multigen-Cluster vor (*HBII-85* und *HBII-52*). Das *HBII-85*-Cluster besteht aus 27 Genkopien und das *HBII-52*-Cluster aus 47 Kopien (Cavaillé *et al.*, 2000; Runte *et al.*, 2001). SnoRNAs sind kleine metabolisch stabile RNAs, die hauptsächlich eine Funktion bei der posttranskriptionellen Modifikation von Nukleotiden ribosomaler RNA (rRNA) haben. Aufgrund ihrer Sequenzmotive werden die snoRNAs in zwei Gruppen aufgeteilt, die C/D-Box-snoRNAs und die H/ACA-Box-snoRNAs. Durch Bildung spezifischer Basenpaarungen, die das zu modifizierende rRNA-Nukleotid spannen, vermitteln C/D-Box-snoRNAs 2'-O-Ribose-Methylierungen, während H/ACA-BOX-snoRNAs Pseudouridinylierungen vermitteln (Kiss-Lazlo *et al.*, 1996; Bachellerie und Cavaillé, 1997; Ganot *et al.*, 1997). Bei den snoRNAs in der PWS/AS-Region handelt es sich um C/D-Box-snoRNAs. Das *HBII-52* Gencluster wird ausschließlich im Gehirn exprimiert, wohingegen die anderen snoRNAs auch in verschieden anderen Geweben exprimiert werden. Die snoRNAs der *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit besitzen jedoch keine Antisense-Elemente, die komplementär zu ribosomaler RNA sind und sind möglicherweise an der Modifikation von mRNAs beteiligt. *HBII-52* spielt möglicherweise eine Rolle beim Adenosin zu Inosin Editing der HT<sub>2C</sub>R Serotonin-Rezeptor prä-mRNA. Zumindest konnten Hinweise

darauf bei dem Maus Ortholog *MBII-52* gefunden werden (Vitali *et al.*, 2005). *HBII-52* enthält 18 Nukleotide, die komplementär zum alternativ gespleißten Exon Vb des Serotonin-Rezeptors HT<sub>2C</sub>R sind und reguliert das alternative Splicing der mRNA (Kishore und Stamm, 2006). Patienten mit PWS exprimieren *HBII-52* nicht und haben andere HT<sub>2C</sub>R Isoformen als gesunde Individuen. Die Autoren nehmen an, dass der Defekt bei der Prozessierung der prä-mRNA zum Prader-Willi-Syndrom beiträgt. Runte *et al.* (2005) hingegen fanden, dass Individuen mit einer paternalen Deletion des kompletten *HBII-52* Genclusters keinen offensichtlichen klinischen Phänotyp zeigen und schließen daraus, dass die *HBII-52*-snoRNA Gene keine wesentliche Rolle bei PWS spielen.

Zwischen *NDN* und *SNURF-SNRPN* liegt das intronlose Gen *C15orf2*. Es kodiert für ein aus 1156 Aminosäuren bestehendes Protein unbekannter Funktion. Es wird in Testis biallelisch exprimiert (Färber *et al.*, 2000), im fetalen Gehirn jedoch monoallelisch (Buiting *et al.*, 2007). Kürzlich wurden zwei neue Gene identifiziert, die zwischen *NDN* und *C15orf2* liegen und nicht für Proteine kodieren: *prader-willi region non-protein-coding RNA 1* und *2* (*PWRN1* und *PWRN2*) (Buiting *et al.*, 2007). *PWRN1* wird in Testis und Niere biallelisch exprimiert, in fetalem Gehirn jedoch monoallelisch. *PWRN2* wird nur in Testis exprimiert. Dort erfolgt die Expression biallelisch. Die gehirnspezifische, monoallelische Expression von *PWRN1* und *C15orf2*, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Transkripte möglicherweise eine Rolle bei PWS spielen.

Distal der PWS-kritischen Region wurde das Gen *UBE3A* (E6-AP Ubiquitin Protein Ligase 3A) identifiziert (Sutcliffe *et al.*, 1997). Es kodiert für eine Ubiquitin-Protein Ligase, die Proteine mit Ubiquitin markiert und somit der Degradierung durch die Ubiquitin vermittelte Proteolyse zuführt (Scheffner *et al.*, 1995). In bestimmten Gehirnbereichen wird *UBE3A*, sowohl beim Menschen als auch bei der Maus ausschließlich vom maternalen Allel exprimiert (Rougeulle *et al.*, 1997; Vu und Hoffmann, 1997; Albrecht *et al.*, 1997). Bezüglich der Expression in anderen Geweben gibt es unterschiedliche Arbeiten. Vu und Hoffman (1997), Rougeulle *et al.* (1997) und Sutcliffe *et al.* (1997) beschreiben eine biallelische Expression des *UBE3A* Gens in Fibroblasten, Lymphoblasten, im Herz, in der Leber und in weiteren Organen, während Herzing *et al.* (2002) mittels RNA-FISH Analysen eine präferentiell maternale Expression in Fibroblasten, Lymphoblasten und neuronalen Vorläuferzellen zeigen. 200 kb distal von *UBE3A* befindet sich das Gen *ATP10C*, das im Gehirn ebenfalls nur vom maternalen Allel exprimiert wird (Herzing *et al.*, 2001). Es kodiert für eine putative Aminophospholipid Translokase (Meguro *et al.*, 2001).

Die *de novo* Deletionen schließen auch Gene mit ein, die nicht dem Imprinting unterliegen. Weiter distal von *ATP10C* liegen die GABA-Rezeptor Gene *GABRB3*, *GABRA5* und *GABRG3*, deren Verlust mit einer Modifizierung des AS-Phänotyps diskutiert wird (DeLorey *et al.*, 1998) und das *P*-Gen (*pink-eyed dilution*-Gen), das mit Oculocutanem Albinismus Typ 2 (OCA2) assoziiert ist. Der Verlust einer Genkopie führt bei Patienten mit PWS oder AS zu einer Hypopigmentierung (Spritz *et al.*, 1997).

Patienten mit einer Klasse I Deletion sind im Gegensatz zu Patienten mit einer Klasse II Deletion zusätzlich hemizygot für vier Gene, die zwischen den Deletionsbruchpunktclustern I und II liegen. Dies sind die Gene *NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIP1* und *GCP5* (Chai *et al.*, 2003). Heterozygote Mutationen in *NIPA1* führen zu einer autosomal dominanten spastischen Paraplegie (Rainier *et al.*, 2003; Reed *et al.*, 2005). Da eine spastische Paraplegie bei Patienten mit AS oder PWS und einer Klasse I Deletion jedoch noch nie beobachtet wurde, ist es wahrscheinlich, dass ein mutantes Protein und keine reduzierte Gendosis zu dieser Erkrankung führt. Butler *et al.* (2004) berichten, dass es klinische Unterschiede zwischen PWS Patienten mit Klasse I und Klasse II Deletionen gibt. Bei Patienten mit Klasse I Deletionen gibt es Hinweise darauf, dass die Patienten häufiger Verhaltensprobleme haben als Patienten mit Klasse II Deletionen.

Die ausschließlich paternale Expression von *MKRN3*, *NDN* und *SNURF-SNRPN* ist mit differentieller DNA-Methylierung assoziiert. Die Promoter/Exon 1 Regionen dieser Gene sind auf dem paternalen Chromosom unmethyliert, während sie auf dem maternalen Chromosom methyliert sind (Glenn *et al.*, 1993; Zeschnigk *et al.*, 1997a). Die paternale Expression der snoRNA Gene wird indirekt durch die *SNURF-SNRPN* Expression reguliert, da sie in den Introns der paternal exprimierten *SNURF-SNRPN* Transkriptionseinheit liegen. Der Methylierungsstatus des paternal exprimierten Gens *MAGEL2* ist bisher noch nicht genau untersucht. Die maternal exprimierten Gene *UBE3A* und *ATP10C* sind nicht differentiell methyliert. Vermutlich wird die Expression von *UBE3A* im Gehirn durch das paternal exprimierte, gehirnspezifische *SNURF-SNRPN* Sense/*UBE3A* Antisense Transkript reguliert (Rougeulle *et al.*, 1998; Chamberlain und Brannan, 2001; Yamasaki *et al.*, 2003; Runte *et al.*, 2004). Da das genaue 3'-Ende des *SNURF-SNRPN* Sense/*UBE3A* Antisense Transkripts bisher nicht genau definiert ist (Runte *et al.*, 2001), ist es möglich, dass es sich bis in den *ATP10C* Locus erstreckt und somit auch eine Rolle bei der geprägten Expression dieses Gens spielt.



### 1.2.3 Mausmodelle für das Prader-Willi- und das Angelman-Syndrom

Die orthologe Region zu 15q11-q13 befindet sich bei der Maus in der Chromosomenregion 7C. Die Gene unterliegen ebenfalls dem Imprinting und sind ähnlich angeordnet wie beim Menschen. Somit eignet sich die Maus als Modellorganismus, um sowohl die Effekte einer UPD, chromosomaler Deletionen als auch Knock-outs für individuelle Gene und regulatorischer Elemente zu untersuchen. Mäuse mit einer maternalen Duplikation oder einer Deletion der Region 7C weisen einen PWS-ähnlichen Phänotyp auf. Sie sind kleiner als Wildtyp-Mäuse und sterben innerhalb der ersten Tage bzw. Wochen, was auf eine reduzierte Saug-Aktivität zurückzuführen ist (Cattanach *et al.*, 1992; Gabriel *et al.*, 1999). Es gibt auch mehrere Maus-Modelle bei denen einzelne Gene deletiert wurden. Knock-out Mäuse für das *MKRN3*-Homolog *Zfp127* scheinen normal zu sein (Jong *et al.*, 1999). Sie sind lebensfähig und fertil, was darauf hindeutet, dass *MKRN3* keine signifikante Rolle bei PWS spielt. *Magel2* Knock-out Mäuse, die in konstanter Dunkelheit gehalten werden, behalten zwar den Circadianischen Rhythmus bei, zeigen aber eine reduzierte Aktivität (Kozlov *et al.*, 2007). Zudem weisen sie eine neonatale Wachstumsretardierung, eine übermäßige Gewichtszunahme ab der fünften bis zur zwölften Woche nach der Geburt und eine erhöhte Körperfettmasse mit einem verändertem Metabolismus im Erwachsenenalter auf (Bischof *et al.*, 2007). Für *Ndn* gibt es verschiedene Mausmodelle, bei denen je nach genetischem Hintergrund der Mäuse unterschiedliche Phänotypen beobachtet worden sind. Bei einer Studie von Tsai *et al.*, (1999a) zeigte sich kein auffälliger Phänotyp. Weitere Studien zeigten jedoch, dass es bei Mäusen mit einer paternalen Deletion des *Ndn* Gens zu einer postnatalen Letalität mit variabler Penetranz kommt, die vermutlich abhängig von dem verwendeten Mausstamm ist (Gerard *et al.*, 1999; Muscatelli *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2003). Die Letalität wird vermutlich durch respiratorische Probleme verursacht. Lebensfähige Mäuse weisen Veränderungen im Hypothalamus und Verhaltensauffälligkeiten auf. Die Mäuse kratzen sich auffällig häufig und zeigen eine verbesserte räumliche Lern- und Merkfähigkeit. Diese auffälligen Parallelen zu Patienten mit PWS deuten darauf hin, dass *NDN* wenigstens für einige der klinischen Merkmale von PWS verantwortlich ist (Muscatelli *et al.*, 2000). Die Mäuse sind jedoch fertil und nicht fettleibig. Mäuse mit einer kleinen intragenischen Deletion im *Snurf-Snrpn* Gen sind phänotypisch normal (Yang *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1999b). Um IC-Deletionen, die immer die Promoter/Exon 1 Region des *SNURF-SNRPN* Gens beinhalten zu untersuchen, wurden verschiedene Mausmodelle entwickelt. Bei Mäusen mit einer 42 kb großen paternalen Deletion, die die Exons 1 – 6 und das putative PWS-IC beinhaltet, kommt es zu einem

Expressionsverlust der Gene *Snurf-Snrpn*, *Zfp127* und *Ndn*, was zeigt, dass auch bei der Maus die gesamte geprägte Region durch das IC reguliert wird. Die Mäuse sind kleiner als die Wildtypmäuse und sterben in den ersten Tagen nach der Geburt (Yang *et al.*, 1998). Mäuse mit einer paternalen Deletion von *Snurf-Snrpn* bis *Ube3a* sind klein, hypoton und sterben zu 80% kurz nach der Geburt. Die überlebenden Mäuse sind fertil und nicht fettleibig (Tsai *et al.*, 1999b; Chamberlain *et al.*, 2004). Bei Mäusen mit einer paternalen Deletion von *Ipw* bis *Ube3a* kommt es zu keinem auffälligen Phänotyp (Nicholls *et al.*, 1999). Das lässt vermuten, dass die kritische Region für viele PWS-Merkmale zwischen *Snurf-Snrpn* und den früher als *Ipw* bezeichneten Exons liegt. Diese Region enthält keine Protein-kodierenden Gene, sondern nur die snoRNA Gene *MBII-85*, *MBII-13* und *MBII-437*. *Ube3a* Knock-out Mäuse dienen als Modell für AS. Mäuse mit einer *Ube3a*-Nullmutation auf dem maternalen Chromosom sind lebensfähig und weisen einen AS-ähnlichen Phänotyp mit Funktionsstörungen der Motorik, induzierbaren Krampfanfällen und Lernschwierigkeiten auf (Jiang *et al.*, 1998). Auch eine partielle paternale UPD des Mauschromosoms 7 führt zu einem Phänotyp mit typischen AS-Merkmalen (Cattanach *et al.*, 1997). Sie haben unter anderem eine milde Gang-Ataxie, zeigen Verhaltensauffälligkeiten und EEG Veränderungen.

### 1.3 Zielsetzung

Genetische Studien haben gezeigt, dass der PWS-SRO für die post-zygotische Aufrechterhaltung des väterlichen Imprints im frühen Embryo benötigt wird. Der AS-SRO interagiert möglicherweise mit dem PWS-SRO, um den mütterlichen Imprint in der weiblichen Keimbahn zu etablieren. Die molekularen Mechanismen sind unbekannt, aber es sind wahrscheinlich *Trans*-Faktoren involviert, die an den AS-SRO und den PWS-SRO binden. Daher ist es möglich, dass es DNA Sequenzvarianten in den Protein-Bindestellen des Imprinting Centers gibt, die die Bindung von *Trans*-Faktoren und somit den epigenetischen Status der chromosomalen Domäne beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es Imprinting Center Sequenzvarianten gibt, die mit einer genetischen Prädisposition für Imprintingfehler assoziiert sind.

Zudem ist es möglich, dass die spontane Epimutationsrate durch *Trans*-Faktoren modifiziert wird. Ein viel versprechender Kandidat für einen indirekten *Trans*-Faktor ist das 5,10-Methylentetrahydrofolat Reduktase (*MTHFR*) Gen. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob eine häufige Mutation in diesem Gen das Risiko für einen Imprinting Defekt erhöht.

Weiterhin sollen *Trans*-Faktoren, die direkt auf das Imprinting Center wirken, untersucht werden. Mittels des Yeast-One-Hybrid Systems wurden von Barbara Gärtner-Ruprecht (Kinderklinik, Universität Mainz) putative Bindeproteine des AS-SRO identifiziert. Eins davon ist TIEG1 (TGF $\beta$ -inducible early growth response 1). Die Rolle, die TIEG1 beim maternalen Imprinting spielt, soll im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden.

In den letzten Jahren wurden alternative *SNURF-SNRPN* Transkripte identifiziert, die an zwei unterschiedlichen Transkriptionsstartstellen initiiert werden, u1A und u1B. U1A und u1B weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit zueinander und zu einer weiteren Region, u1D, auf. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Methylierungsstatus von u1B im Detail analysiert werden und der Methylierungsstatus von u1D bestimmt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Heidelberg), Serva (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Peqlab (Erlangen), BD (Heidelberg), Roche (Mannheim) und GibcoBRL (Eggenstein) in *pro analysis* Qualität bezogen. Die Radiochemikalien wurden von der Firma GE Healthcare (München) bezogen.

#### 2.1.2 Standardlösungen

|                      |   |
|----------------------|---|
| 6x DNA Probenpuffer: | 0,25% Bromphenolblau oder Xylenblau, 15% Ficoll, 10 mM EDTA                                 |
| TAE-Puffer:          | 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0  |
| TBE-Puffer:          | 89 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA, pH 8,0   |
| TE-Puffer:           | 10 mM Tris-HCl, pH 7,8<br>1 mM EDTA   |
| PBS:                 | 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ |

#### 2.1.3 Medien

##### 2.1.3.1 Medien für die Kultur von Bakterien

|                     |  |
|---------------------|--|
| LB-Medium (für 1l): | 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl |
| LB-Platten:         | 12 g/l Bacto-Agar (Difco) in LB-Medium   |

|             |                            |
|-------------|----------------------------|
| Ampicillin: | Endkonzentration 100 µg/ml |
| Kanamycin:  | Endkonzentration 50 µg/ml  |
| X-Gal:      | Endkonzentration 32 µg/ml  |

### 2.1.3.2 Medien für die Kultur von Hefen

#### Vollmedien

|                |  |
|----------------|--|
| YPD (für 1l):  | 10 g Hefe-Extrakt<br>20 g Pepton<br>20 g $\alpha$ -D-Glukose   |
| YPAD (für 1l): | 10 g Hefe-Extrakt<br>20 g Pepton<br>20 g $\alpha$ -D-Glukose<br>10 ml L-Adeninlösung (500 mg/100 ml) |
| bei Platten:   | 20 g/l Bacto-Agar  |

#### Mangelmedien

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| SD-Medium (für 1l):                  | 6,7 g Yeast nitrogen base ohne Aminosäuren<br>20 g $\alpha$ -D-Glukose<br>100 ml der entsprechenden 10X Dropout (DO) Solution |
| bei Platten:                         | 20 g/l Bacto-Agar   |
| 10X -Leu/-Trp DO Solution:           | 6,4 g/l -Leu/-Trp DO Supplement (Clontech)  |
| 10X -Leu/-Trp/-His/-Ade DO Solution: | 6 g/l -Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement<br>(Clontech)   |
| 10X -Leu DO Solution:                | 6,4 g/l -Leu/-Trp DO Supplement (Clontech)<br>10 ml L-Leucin (5 mg/ml)  |

### 2.1.3.3 Medien für die Kultur von Zellen

F-12 Nutrient Mixture (Ham) mit GlutaMAX™ I (GIBCO)

Opti-MEM® I Serumreduziertes Medium (GIBCO)

Mycoplex™ Fötales Kälberserum (FKS) (PAA)

Trypsin/EDTA:                    2 g/l Trypsin  
   0,2 g/l EDTA  
   in PBS (pH 7,2) ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

### 2.1.4 Stämme und Zelllinien

#### 2.1.4.1 Bakterienstamm

*E. coli* DH5α:                    F', endA1, hsdR17, ( $\text{r}_k^- \text{m}_k^+$ ), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal<sup>r</sup>),  
relA1, D(lacIZYA-argF), U169, deoR, (Φ80dlacD(lacZ)M15)

#### 2.1.4.2 Hefestamm

AH109:                            *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*,  
*LYS2* : : *GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*, *GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2*,  
*URA3* : : *MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ*

#### 2.1.4.3 Zelllinie

CHO-K1                            chinesische Hamster Ovar Zellen, bezogen vom DSMZ

### 2.1.5 Plasmide

pGEM®-T Easy                    Vektor für die Klonierung von PCR-Produkten (Promega)  
pCR® II-TOPO®                    Vektor für die Klonierung von PCR-Produkten (Invitrogen)

Expressionsplasmide

|         |   |
|---------|---|
| pCS2+MT | (eukaryotischer Expressionsvektor; CMV-Promoter reguliert die Expression der inserierten Konstrukte, die 5' mit einem Myc-Epitop gekoppelt sind; Roth <i>et al.</i> , 1991) |
| pcDNA3  | eukaryotischer Expressionsvektor; inserierte Sequenz wird durch einen CMV-Promoter reguliert (Clontech)   |

Plasmide für das Yeast-Two-Hybrid System

|        |   |
|--------|---|
| pGBKT7 | Hefe-Expressionsvektor mit der GAL4 DNA-Bindungsdomäne (Clontech)     |
| pACT2  | Hefe-Expressionsvektor mit der GAL4 DNA-Aktivierungsdomäne (Clontech) |

Plasmide für den Luciferase Assay

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| pGL3-Basic                  | Reporterplasmid mit dem Gen für die Firefly-Luciferase (Promega)  |
| pGL3-Control                | Reporterplasmid; enthält das Gen für die Firefly-Luciferase unter Kontrolle des SV40-Promoters (Promega)                              |
| pGL4.74 [ <i>hRluc</i> /TK] | Reporterplasmid zur Transfektionskontrolle; enthält das Gen für die Renilla-Luciferase unter Kontrolle des HSV-TK-Promoters (Promega) |

**2.1.6 Größenstandards**

|                       |  |
|-----------------------|--|
| DNA-Größenmarker:     | 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)<br>pUC19 DNA/ <i>MspI</i> (Fermentas) |
| Protein-Größenmarker: | PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas)              |

### 2.1.7 Enzyme

#### Restriktionsendonukleasen:

Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche (Mannheim) oder New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

#### weitere Enzyme:

*AmpliTaq* Gold Polymerase (Roche)

T<sub>4</sub>-DNA-Ligase (Roche)

Proteinase K (Roche)

### 2.1.8 Antikörper

c-Myc Monoclonal Antibody (Clontech)

Stabilized Goat anti-Mouse HRP (PIERCE)

### 2.1.9 cDNA

Human Testis Marathon-Ready cDNA (Clontech)

### 2.1.10 Oligonukleotide und Sonden

siehe Anhang

### 2.1.11 Patienten

Die klinische Diagnose der Patienten mit Prader-Willi-Syndrom bzw. Angelman-Syndrom wurde von erfahrenen Humangenetikern gestellt. Die Methylierungsanalyse der *SNURF-SNRPN* Promotor/Exon 1 Region mittels methylierungs-spezifischer PCR (MS-PCR; Zeschnigk *et al.*, 1997b) zeigte, dass den Patienten mit PWS das unmethylierte Allel fehlt und den Patienten mit AS das methylierte Allel. Bei Patienten mit einem Imprinting Defekt wurde eine biparentale Vererbung der PWS/AS Region mittels Mikrosatelliten Analyse nachgewiesen. Eine IC-Deletion wurde mit Hilfe einer Southern-Blot Analyse, einer



quantitativen TaqMan Analyse (Raca *et al.*, 2004) oder MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) ausgeschlossen bzw. bestätigt. Bei Ausschluss einer IC-Deletion wurde dieser Befund zusätzlich durch Sequenzierung von SNPs (*single nucleotide polymorphism*) im AS-SRO oder PWS-SRO bestätigt. Bei Patienten mit einer *de novo* Deletion von 15q11-q13 wurde die Deletion entweder durch FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung), MLPA oder Mikrosatelliten Analyse diagnostiziert. Bei Patienten mit einer UPD wurde diese durch Mikrosatelliten Analyse bestätigt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Arbeiten mit DNA**

#### **2.2.1.1 Isolierung von DNA aus peripherem Blut**

Zur Präparation von genomischer DNA aus Blut wurden zwei unterschiedliche Methoden der Firma Qiagen verwendet. War genug Blut vorhanden (1-3 ml) und wurde eine größere Menge von DNA benötigt, wurde die FlexiGene-Methode angewandt. Die andere Alternative war die automatisierte Präparation mit der BioRobot EZ1 Workstation. Hierfür reichten kleinere Mengen von Blut (200-350 µl) aus.

#### DNA-Präparation mit FlexiGene

Zu 7.5 ml FG1-Puffer wurden 3 ml EDTA-Blut gegeben und fünfmal invertiert. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert (5 min, 2000 g) und der Überstand verworfen. Zum Pellet wurden 1,5 ml mit Protease versetzter FG2-Puffer gegeben. Das Pellet wurde homogenisiert, der Ansatz dreimal invertiert und 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Zur anschließenden Fällung der DNA wurden 1,5 ml 100%iges Isopropanol zugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren wurde die DNA präzipitiert und der Ansatz für 3 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,5 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation von 3 min bei 2000 g, wurde der Überstand verworfen, das Pellet 5 min an der Luft getrocknet und in 300 µl FG3-Puffer 1 h im 65°C-Heizblock und anschließend bei RT über Nacht auf dem Roller gelöst.

### DNA-Präparation mit der BioRobot EZ1 Workstation

Die Präparation von DNA mit der BioRobot EZ1 Workstation von Qiagen funktioniert vollautomatisch und nach dem Prinzip der magnetischen Trennung. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden kurz zusammengefasst: Die Zellen werden mit Proteinase K aufgeschlossen und mit magnetischen Partikeln gemischt, an die die DNA bindet. Durch ein magnetisches Feld werden die Partikel mit der DNA von dem Rest abgetrennt. Nach einem Waschschrift wird das magnetische Feld abgestellt und die DNA eluiert.

#### **2.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA**

Für die analytische Präparation wurde eine Bakterienkolonie über Nacht in 3 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Aus 1,5 ml der Übernachtskultur wurden die Zellen sedimentiert (4 min, 2600 g) und das Pellet in 300 µl Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurden die Zellen lysiert. Dann wurden 300 µl Puffer P3 (3 M KOAc, pH 5,5) zugegeben und 15 min bei 10300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 500 µl 100%igem Ethanol versetzt und das DNA-Präzipitat sedimentiert (20 min, 16000 g). Das Pellet wurde mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Um im größeren Maßstab reine Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde das "Plasmid Maxi Kit" (Qiagen) verwendet. Hierzu wurden 250 ml Bakteriensuspension sedimentiert und die Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers über Ionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Die DNA wurde in 200 – 300 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion wurden DNA-Fragmente aus genomischer oder Plasmid-DNA amplifiziert. Standardmäßig wurde die *AmpliTaq*<sup>®</sup> Gold DNA Polymerase (Roche) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 1 x Polymerasepuffer, jeweils 0,2 – 0,4 µM Primer, 200 µM dNTPs, 2,5 U Polymerase und 100 – 200 ng Matrizen DNA. Das Endvolumen betrug 50 µl. Es wurden in der Regel 35 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für 15 sec, die Primer-Anlagerung für 30 sec, wobei die Annealing-Temperatur abhängig von den T<sub>m</sub>-Werten der Primer war und die Verlängerung

bei 72°C. Die Verlängerungszeit richtete sich nach der Größe des Amplifikats. Vor dem ersten Zyklus wurde eine Denaturierungsphase von 10 min bei 95°C eingefügt, nach dem letzten Zyklus eine Verlängerungsphase von 7 min bei 72°C.

Um bisulfitbehandelte DNA (siehe 2.2.1.11) zu amplifizieren wurde das HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) verwendet. Einer initialen Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 15 min folgten 35 Zyklen aus je 30 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec Primer-Annealing, wobei die Annealing-Temperatur abhängig von den  $T_m$ -Werten der Primer war, und 30 sec Elongation bei 72°C, wobei sich die Verlängerungszeit nach der Größe des Amplifikats richtete. Anschließend erfolgte eine verlängerte Syntheseperiode für 10 min bei 72°C.

#### **2.2.1.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde entweder das Multiscreen Filtration System (Millipore) oder Microcon (Millipore) benutzt und nach Vorschrift des Herstellers verfahren. Alternativ wurden PCR-Produkte mit ExoSAP-IT<sup>®</sup> (usb) aufgereinigt, wobei es zu keinem Verlust des PCR-Produkts kommt.

#### **2.2.1.5 Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 bis 2 %ige Agarose-Minigele mit 1 x TAE-Puffer und 0,4 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 – 120 Volt. Zur Ermittlung der spezifischen Größe der jeweiligen DNA-Fragmente dienten spezifische Größenstandards.

#### **2.2.1.6 Elution von DNA aus Agarosegelen**

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit oder das MinElute Gel Extraction Kit verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Beide Kits stammen von der Firma Qiagen (Hilden).

### 2.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die genaue Konzentration wurde photometrisch mit Hilfe des Spektralphotometers ND-1000 bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Bei proteinfreier DNA beträgt der Quotient aus der OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> 1,8.

Alternativ wurde die DNA-Konzentration durch Auftragung eines Aliquots auf ein Agarosegel bestimmt. Durch den Intensitätsvergleich der Banden mit dem pUC19 DNA/*MspI* Marker, bei dem die Konzentrationen der einzelnen Banden bekannt waren, konnte die DNA Konzentration abgeschätzt werden.

### 2.2.1.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA wurde mit dem BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1/v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Sequenzierreaktion erfolgte nach folgenden Parametern: Vor dem ersten Zyklus wurde eine Denaturierungsphase von 1 min bei 96°C eingefügt. Es wurden 25 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 96°C für 10 sec, die Primer-Anlagerung bei 50 - 60°C (abhängig von dem T<sub>m</sub>-Wert des Primers) für 5 sec und die Elongation bei 60°C für 4 min. Der Reaktionsansatz wurde anschließend über Sephadex Säulen (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Analyse erfolgte auf dem Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems). Die Auswertung der Sequenz erfolgte mit den Programmen "Sequencing Analysis" (Applied Biosystems), "DNA Star" (Lasergene) oder mit "Sequencher" (Gene Codes Corporation).

### 2.2.1.9 Restriktionsendonukleaseverdau

Für analytische und präparative Zwecke wurden 1 – 3 µg Plasmid-DNA mit 10 – 20 U Restriktionsenzym und entsprechendem Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 2 h bei 37°C verdaut.

### 2.2.1.10 Ligation

Die Ligation mit einem Gesamtvolumen von 15 µl wurde mit 5 U T4 DNA Ligase (Roche) durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA betrug 1:3. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

PCR-Produkte wurden normalerweise zunächst entweder in den pGEM<sup>®</sup>-T Easy, pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> oder pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> Vektor subkloniert, wobei nach Anleitung des Herstellers verfahren wurde.

### 2.2.1.11 Bisulfitbehandlung von DNA

Durch die Bisulfitbehandlung werden nicht-methylierte Cytosine deaminiert und in Uracil umgewandelt. Bei der anschließenden PCR wird das Uracil durch Thymin ersetzt. Methylierte Cytosine sind gegen diese chemische Umwandlung geschützt und verbleiben als Cytosine. Die dadurch entstehenden spezifischen Sequenzunterschiede bei methylierten und nicht methylierten Allelen können in der Sequenzanalyse genutzt werden.

Für die Bisulfitbehandlung wurden 2 µg DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Zur Denaturierung der DNA wurden 5,5 µl 3 M NaOH dazugegeben. Der Ansatz wurde zuerst 15 min bei 37°C und danach 2 min bei 95°C im vorgeheizten Heizblock inkubiert und dann sofort auf Eis gestellt. Für die Bisulfit-Lösung wurden 8,5 g Natrium Bisulfit in 15 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Zugabe von 0,9 ml 50 mM Hydrochinon und 1 ml 10 N NaOH (pH 5,0 – 5,3) wurde das Volumen mit H<sub>2</sub>O auf 20 ml aufgefüllt. Zu der denaturierten DNA wurden 500 µl der Bisulfit-Lösung gegeben und der Ansatz über Nacht bei 50°C im Dunkeln inkubiert. Für die Aufreinigung der bisulfitbehandelten DNA wurde das Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up System (Promega) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die bisulfitbehandelte und aufgereinigte DNA wurde mit 5,5 µl 3 M NaOH 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 55 µl 6 M NH<sub>4</sub>OAc, 1 µl Glycogen (20 mg/ml) und 350 µl Ethanol (100%) zugegeben und die DNA durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 16000 g präzipitiert. Das Pellet wurde mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.2.1.12 SNaPshot

Zur Quantifizierung von methylierten Allelen wurden „quantitative-primer-extension“-Analysen (SNaPshot-Analysen) an bisulfitbehandelter DNA durchgeführt. Hierfür wurden

Primer entwickelt, die mit ihrem 3'-Ende direkt vor dem Cytosin eines CpGs liegen. In der SNaPshot-Reaktion wird der Primer um ein farbmarkiertes Didesoxynukleotid verlängert. Bei der anschließenden Auswertung am Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems) kann aus den Signalintensitäten der jetzt farbmarkierten Primer der beiden Allele das Verhältnis von methylierter DNA zu unmethylierter DNA bestimmt werden. Die Analysen wurden mit dem „SNaPshot Multiplex Kit“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Der SNaPshot-Reaktions-Ansatz (10 µl) setzte sich aus 100 ng aufgereinigtem PCR-Produkt, 5 µl SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix und 1 µl Primer (0,2 µM) zusammen. Die SNaPshot Reaktion erfolgte nach folgenden Parametern: Einer initialen Denaturierung von 3 min bei 96°C folgten 25 Zyklen aus je 10 sec Denaturierung bei 96°C, 5 sec Annealing bei 45 – 60°C (abhängig vom jeweiligen Primer) und 30 sec Elongation bei 60°C. Der SNaPshot-Reaktions-Ansatz wurde durch Zugabe von 1 U SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase (usb)) mit anschließender Inkubation bei 37°C für 60 min und Inaktivierung des Enzyms bei 75°C für 15 min aufgereinigt. 0,5µl des aufgereinigten SNaPshot-Produktes wurden mit 9 µl Formamid (FA) und 0,5 µl GeneScan-120 LIZ size standard (Applied Biosystems) gemischt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Analyse erfolgte auf dem Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems). Die Auswertung erfolgte mit der GeneScan Analysis 3.7 (Applied Biosystems) und der Genotyper 3.7 (Applied Biosystems) Software. Aus den Peak-Integralen der beiden Allele wurde nun das Verhältnis von methyliertem zu unmethyliertem Allel ermittelt, indem das Peak-Integral des methylierten Allels durch das Peak-Integral des unmethylierten Allels dividiert wurde. Hierbei erhält man jedoch nur relative Werte, da die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Fluorophore, mit denen die einzelnen Basen markiert sind, unterschiedlich stark sind. Um absolute quantitative Werte zu ermitteln wurde eine Eichkurve erstellt. Dazu wurde die DNA von komplett methylierten und komplett unmethylierten Klonen in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Mit Hilfe des R Software Pakets (<http://www.r-project.org>) wurde eine Eichkurve erstellt und damit die absoluten Werte der Methylierung berechnet. Um aus den Eichkurven zu einer Rückrechnung auf Methylierungsgrade zu kommen, wurde eine polynomiale Regression angewendet. Eine lineare Funktion hat sich in Vorexperimenten als zu einfach herausgestellt, so dass ein Polynom zweiten Grades (Parabel) verwendet wurde. Die Regression wurde auf logarithmischer Skala zwischen theoretischen (d.h. Mischungsverhältnisse von methylierter und unmethylierter DNA) und beobachteten Verhältnissen mit Hilfe der Methode kleinster Quadrate berechnet. Die logarithmische Skala wurde gewählt, um eine sinnvolle Gewichtung der Einzelbeobachtungen zu gewährleisten.

Die Methylierungsgrade wurden durch Rückrechnung von beobachteten DNA-Verhältnissen von Patienten-Proben numerisch bestimmt.

#### **2.2.1.13 TaqMan® SNP Genotyping Assays**

Die allelische Diskriminierung erfolgte unter anderem mittels TaqMan® SNP Genotyping Assays von Applied Biosystems. Es wurden entweder TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assays (Assays-on-Demand) oder Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays (Assays-by-Design) verwendet. Die Assays enthalten zwei Primer um den zu analysierenden Bereich zu amplifizieren und zwei fluoreszenzmarkierte Sonden, die spezifisch an ein Allel binden. Die Sonde für das Allel 1 ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff VIC markiert, die Sonde für das Allel 2 ist FAM markiert. Zusätzlich enthalten die Sonden noch einen nichtfluoreszierenden Quencher, der, solange die Sonde intakt ist, die Fluoreszenz unterdrückt. Während der PCR lagert sich jede Sonde spezifisch an ein Allel an. Die DNA-Polymerase verlängert die Primer am 3' Ende und degradiert durch ihre 5'-3' Nuclease-Aktivität die Sonden, die an die DNA hybridisiert haben. Dadurch wird der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher getrennt und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal. Sonden die nicht an die DNA hybridisiert haben werden nicht gespalten und es kommt zu keinem Fluoreszenzsignal. Je nach gemessenem Fluoreszenzsignal (VIC oder FAM) kann nun bestimmt werden, welche Allele vorhanden sind. Die PCR-Reaktion wurde mit 12,5 ng DNA in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren folgende: Zunächst erfolgte eine Denaturierung bei 95°C für 10 min, dann folgten 40 Zyklen aus je 15 sec Denaturierung bei 92°C und je 1 min Annealing und Verlängerung bei 60°C. Die Proben wurden in einem ABI PRISM Sequence Detection System 7000 analysiert. Zur Auswertung wurde die SDS 1.1 Software für allelische Diskriminierung (Applied Biosystems) verwendet. Die verwendeten Assays-by-Demand und die Primer- und Sondensequenzen der Assays-by-Design sind im Einzelnen im Anhang aufgeführt.

## 2.2.2 Bakterien

### 2.2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterienzellen, die DNA aus der sie umgebenden Lösung aufnehmen können (kompetente Zellen), wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll der Rubidiumchlorid-Methode (Maniatis *et al.*, 1982) hergestellt. Eine Bakterienkolonie des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  wurde in 10 ml b-Medium (für 1 Liter: 5 g Hefe-Extrakt, 20 g Bacto-Trypton, 5 g MgSO<sub>4</sub>, pH 7,6, mit KOH eingestellt) bei 37°C und 250 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0,3 inkubiert. Von der Kultur wurden 5 ml in 100 ml b-Medium überführt und bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen eines OD<sub>550</sub>-Wertes von 0,48 wurden je 25 ml der Kultur in vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen für 15 min bei 1250 g und 4°C sedimentiert und das Pellet vorsichtig in 10 ml kaltem TfbI-Puffer (30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin, pH 5,8, mit 0.2 M HAc einstellen) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min auf Eis wurden die Zellen erneut für 15 min bei 1250 g und 4°C sedimentiert und das Pellet in 1 ml kaltem TfbII-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin, pH 6,5, mit KOH eingestellt, aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 100  $\mu$ l-Aliquots in eiskalte Eppendorfgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Es wurden 5  $\mu$ l eines Ligationsansatzes zu 50  $\mu$ l kompetenten Bakterienzellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 2 min bei 42°C, dann wurde der Ansatz 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 450  $\mu$ l LB-Medium wurde der Ansatz 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 150  $\mu$ l und 350  $\mu$ l der Kultur wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.



### 2.2.3 Hefen

#### 2.2.3.1 Yeast-Two-Hybrid Screen

Mit dem Yeast-Two-Hybrid System können Protein-Protein-Interaktionen in Hefezellen *in vivo* nachgewiesen werden (Fields und Song, 1989; Chien *et al.*, 1991). Man kann entweder die Wechselwirkung von zwei bekannten Proteinen untersuchen oder, wie in dieser Arbeit, eine cDNA-Bank auf Interaktionspartner mit einem bekannten Köderprotein überprüfen. Das System beruht darauf, dass viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus zwei funktionell unabhängigen Domänen bestehen. So enthält der GAL4-Transkriptionsfaktor der Hefe eine DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und eine Aktivierungsdomäne (AD) (Johnston *et al.*, 1986). Die DNA-BD bindet an die GAL4 UAS (*upstream activating sequence*), die stromaufwärts eines Reportergens liegt. Die AD interagiert mit den Komponenten der Transkriptionsmaschinerie und fungiert als Transkriptionsaktivator. Beide Domänen sind für die Aktivierung der Transkription notwendig und normalerweise Teil eines einzigen Proteins. Es wurde aber *in vivo* nachgewiesen, dass die Aktivierung der Transkription auch dann möglich ist, wenn die Domänen auf zwei unterschiedlichen Proteinen lokalisiert sind (Hope und Struhl, 1986; Keegan *et al.*, 1986). Diese Tatsache macht man sich im Yeast-Two-Hybrid System zu nutze. Hierbei setzt man einen Expressionsvektor ein, der für die DNA-BD des GAL4 Transkriptionsfaktors kodiert (pGBKT7) und mit der cDNA des gewünschten Proteins fusioniert ist, und einen Expressionsvektor, der für die AD des GAL4-Transkriptionsfaktors kodiert (pACT2) und mit cDNAs aus spezifischen Geweben (cDNA-Bank) fusioniert ist. Weiterhin kodieren die Expressionsvektoren für Enzyme, die für die Synthese von Aminosäuren nötig sind, für die der eingesetzte Hefestamm auxotroph ist. Beide Plasmide werden in den Hefestamm AH109, in dem das GAL4-Gen deletiert ist, transformiert. Dieser enthält in seinem Genom vier Reportergene (*HIS3*, *ADE2*, *lacZ* und *MEL1*) unter der Kontrolle von unterschiedlichen GAL4-induzierbaren Promotoren (*GAL1*, *GAL2* und *MEL1*). Des Weiteren ist er auxotroph für Adenin, Histidin, Tryptophan und Leucin, wodurch eine effiziente Selektion ermöglicht wird. Interagieren zwei Proteine miteinander, wird die GAL4-AD zur DNA-BD rekrutiert und es kommt zur Transkription der Reportergene. Somit können die Hefezellen auf Selektionsmedien ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin wachsen.

Das Yeast-Two-Hybrid System wurde verwendet um potentielle Bindepartner von TIEG1 zu identifizieren. Dazu wurde die cDNA von TIEG1 in das Plasmid pGBKT7 inseriert. Der

Yeast-Two-Hybrid Screen wurde mit dem „MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech)“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als cDNA Bank wurde die „Human Ovary MATCHMAKER cDNA Library“ (Clontech) verwendet.

#### **2.2.3.2 Transformation von Hefezellen (modifiziert nach Gietz *et al.*, 1992)**

Hefezellen wurden mit der Lithium-Acetat-Methode chemisch transfiziert. Eine 5 ml Übernachtkultur wurde in 50 ml YPD-Medium gegeben und bei 30°C und 250 rpm inkubiert bis die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,4 – 0,6 erreicht hatte. Die Zellen wurden sedimentiert (5 min, 400 g) mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen, in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Dann wurden die Zellen mit 1 ml TE/LiAc-Puffer (0,1 M LiAc (pH 7,5), 0,01 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,001 M EDTA) gewaschen und resuspendiert. 50 µl der Hefe-Suspension wurden mit 1 µg der zu transformierenden DNA und 50 µg einzelsträngiger Lachs DNA, die als Carrier diente, gemischt. Nach Zugabe von 300 µl 40% PEG 4000 (in TE/LiAc-Puffer) wurde das Gemisch für 30 min bei 30°C inkubiert und nach einer Hitzeschockbehandlung (42°C, 15 min) auf entsprechenden Agar-Platten ausplattiert.

#### **2.2.3.3 Gewinnung von Hefeextrakten**

Zur Gewinnung eines Proteinextraktes aus Hefen wurde eine 2 ml Mangel-Medium-Kultur angeimpft. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,3 wurden 1,5 ml der Kultur sedimentiert (900 g, 5 min). Das Pellet wurde in 50 µl 4x SDS-Probenpuffer resuspendiert und 4x in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37°C aufgetaut. Nach einer Präzipitierung der Festbestandteile (17400 g, 5 min) wurden aus dem Überstand 25 µl durch SDS-PAGE analysiert.

#### **2.2.3.4 DNA-Präparation aus Hefe**

Die Hefen wurden über Nacht in 3-5 ml YPD-Medium bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 2600 g und RT abzentrifugiert und das Pellet in 400 µl DB-Puffer (1M Sorbitol, 1 mM EDTA) resuspendiert. Dann wurden 40 µl Zymolase (20 mg/ml) zugesetzt und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (2 min, 2600 g) und das Pellet in 250 µl Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100

µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) erfolgte eine 3-minütige Inkubation bei RT. Dann wurden 500 µl Puffer N3 (Qiagen) zugegeben, 2 min inkubiert und 20 min bei 17400 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die DNA mit dem QIAquick 8 PCR Purification Kit (50) (Qiagen) aufgereinigt.

## **2.2.4 Zellkultur**

### **2.2.4.1 Kultivierung der Zellen**

Die CHO-K1 Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C unter Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt und sämtliche Geräte und Lösungen vor der Benutzung sterilisiert.

### **2.2.4.2 Passagieren von Zellen**

Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von ca.  $10 \times 10^6$  Zellen pro Zellkulturflasche (Nunc, 80 cm<sup>2</sup>) geerntet. Das Kulturmedium wurde von den adhärent wachsenden Zellen vollständig abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch eine 3-5-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA abgelöst. Ein Teil der Zellen wurde in einer Zelldichte von  $10^5 - 10^6$  Zellen pro Flasche auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

### **2.2.4.3 Transiente Transfektion von Zellen**

Die Transfektion der Zellen für die Luciferase-Reporter Experimente erfolgte mittels FuGENE 6 (Roche). Hierzu wurden die entsprechenden Plasmide in 150 µl Opti-MEM Medium verdünnt. In einem weiteren Eppendorfgefäß wurde die dreifache Menge (µg DNA/µl FuGENE) an FuGENE 6, bezogen auf die Menge der zu transfizierenden DNA in 150 µl Opti-MEM verdünnt. Nach 5 minütiger Inkubation wurde die verdünnte DNA mit dem verdünnten FuGENE gemischt und weitere 20-30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Komplexe in 50 µl Aliquots auf die Zellen gegeben (96 Well Format, pro Well ca.  $1 \times 10^4$  Zellen) und für 48 h bei 37°C inkubiert.

#### **2.2.4.4 Luciferase-Reportergen Assay**

Um den Effekt von TIEG1 auf den AS-SRO zu untersuchen wurden Luciferase-Reportergen Assays durchgeführt. Die hierfür durchgeführten Transfektionen von CHO-K1 Zellen erfolgten mittels FuGENE 6. Es wurden das Reporterplasmid und das für TIEG1 kodierende Plasmid transfiziert. Um die Menge der verwendeten DNA innerhalb eines Experiments zu normieren wurden die Ansätze bei Bedarf mit leerem Plasmid aufgefüllt. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde zusätzlich ein Reporterkonstrukt transfiziert, das das Gen für die Renilla Luciferase enthält und im Verhältnis 1:10 eingesetzt wurde. Die Luciferase-Reporter Assays wurden mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) durchgeführt. Nach 48-stündiger Inkubation der transfizierten Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden sie in 20 µl Lyse-Puffer aufgenommen und für 20 min lysiert. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit dem Luminometer Centro LB 960 (Berthold Technologies). Die relative Luciferase-Aktivität wurde berechnet indem der Quotient aus der Firefly Luciferase-Aktivität und der Renilla Luciferase-Aktivität gebildet wurde. Es wurden jeweils sechsfach Messungen durchgeführt.

#### **2.2.5 Proteine**

##### **2.2.5.1 *In vitro* Synthese von Proteinen**

Zur *in vitro* Synthese wurde das TNT™ Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) benutzt. Jeder Ansatz (50 µl) enthielt 25 µl Retikulozyten-Lysat, 2 µl Reaktionspuffer, 1 µl SP6-Polymerase, 1 µl Aminosäure-Mix, 2 µl RNasin (20 U/µl) und das DNA-Template (1 µg). Der Reaktionsansatz wurde für 90 min bei 30°C inkubiert.

##### **2.2.5.2 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) dient zum Nachweis einer Protein-DNA Interaktion *in vitro*. Dazu wird ein radioaktives DNA-Fragment mit einem Protein inkubiert. Im Falle einer Protein-DNA Interaktion wandern die Komplexe im nativen Polyacrylamidgel langsamer als die freie DNA und können mittels Autoradiografie als verzögerte Bande (Shift) dargestellt werden. Die Spezifität der Bindung kann durch die Verwendung eines Antikörpers

nachgewiesen werden, wobei der DNA-Protein-Antikörper-Komplex noch langsamer im Gel wandert und es zu einem „Supershift“ kommt.

In dieser Arbeit wurde die Methode verwendet um die Interaktion von TIEG1 an den AS-SRO zu analysieren. Hierzu wurde 1 µl das radioaktiv markierten doppelsträngigen Oligonukleotids (40.000 cpm/µl) mit 10 µl Bindepuffer, 2 µl des *in vitro* synthetisierten Proteins und gegebenenfalls mit 1 µl Antikörper bei RT 20 min inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Auftrennung durch eine Gelelektrophorese (100 V, 2 – 2 ½ h). Anschließend wurde das Gel getrocknet und mit einem Röntgen-Film (Biomax MS, Kodak) zwischen 6 und 16 h exponiert.

|              |         |                   |
|--------------|---------|-------------------|
| Bindepuffer: | 35,8 mM | HEPES (pH 7,8)    |
|              | 43,2 mM | KCl               |
|              | 1,42 mM | MgCl <sub>2</sub> |
|              | 2,84 mM | DTT               |
|              | 5,37%   | Glycerin          |
|              | 3%      | Ficoll            |
|              | 2 µg    | poly dIdC         |

|                |         |                    |
|----------------|---------|--------------------|
| Acrylamid-Gel: | 5 ml    | 10x TBE            |
|                | 13,3 ml | Rotiphorese Gel 30 |
|                | 81 ml   | H <sub>2</sub> O   |
|                | 500 µl  | 10% APS            |
|                | 150 µl  | TEMED              |

|             |        |                  |
|-------------|--------|------------------|
| Laufpuffer: | 950 ml | H <sub>2</sub> O |
|             | 50 ml  | 10x TBE          |

### 2.2.5.3 Annealing der Oligonukleotide

Zur Anlagerung der beiden Oligonukleotide wurden jeweils 50 µl der komplementären Oligonukleotide (100 µM) mit 50 µl 1M Tris (pH 7,6 – 8,0) und 50 µl H<sub>2</sub>O gemischt. Der Ansatz wurde 3 min bei 95°C inkubiert und dann langsam auf RT abgekühlt.



|                           |                    |         |
|---------------------------|--------------------|---------|
| Trenngel 10% (für 2 Gele) | 4x Trenngelpuffer  | 2,5 ml  |
|                           | Rotiphorese Gel 30 | 3,33 ml |
|                           | H <sub>2</sub> O   | 4,09 ml |
|                           | APS (10%)          | 150 µl  |
|                           | TEMED              | 15 µl   |
| Sammelgel (für 2 Gele)    | 4x Sammelgelpuffer | 2,5 ml  |
|                           | Rotiphorese Gel 30 | 1,3 ml  |
|                           | H <sub>2</sub> O   | 6,2 ml  |
|                           | APS (10%)          | 150 µl  |
|                           | TEMED              | 15 µl   |

#### 2.2.5.6 Proteintransfer und -nachweis (Western-Blot)

Zum Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond<sup>TM</sup>-c extra, Amersham) wurde das Semi-dry-Verfahren (Transfer-Apparatur der Firma BIO-RAD) angewendet. Dazu wurde auf der (Graphit)-Anode ein Blot in folgender Reihenfolge aufgeschichtet: Drei Lagen Whatman 3MM-Papier, eine Hybond<sup>TM</sup>-c-Membran, das Proteingel und abschließend drei Lagen Whatman 3MM-Papier (alle Komponenten wurden mit Transfer-Puffer angefeuchtet). Der Transfer erfolgte für 1,5 – 2 h bei 1.5 mA/cm<sup>2</sup>. Zum Nachweis der Proteine wurden zunächst freie Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierlösung abgesättigt (Inkubationszeit 30 min). Anschließend wurde die Membran mit dem 1. Antikörper in Blockierlösung für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Membran wurde 3x mit PBS gewaschen und für 1 – 3 h mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Zweit-Antikörper (PIERCE; 1:1000 in Blockierlösung) bei RT inkubiert. Nach 4-maligem Waschen mit PBS wurde der Western-Blot entwickelt. Hierzu wurde das SuperSignal<sup>®</sup> West Dura Extended Duration Substrate (PIERCE) verwendet. Es wurden 750 µl der SuperSignal West Dura Luminol/Enhancer Solution mit 750 µl der SuperSignal West Dura Stable Peroxide Solution gemischt. Der Blot wurde anschließend 5 min in dieser Lösung inkubiert, die überschüssige Flüssigkeit abgegossen und der Blot in Haushaltsfolie eingeschlagen. Ein Röntgen-Film (Fuji) wurde aufgelegt und nach 30 sec bis 10 min entwickelt.

|                  |   |
|------------------|---|
| Transfer-Puffer: | 5,82 g/l Tris-Base<br>2,93 g/l Glycin<br>3,75 ml 10% SDS<br>200 ml Methanol<br>ad 1000 ml bidest Wasser |
| Blockierlösung:  | 4% Magermilchpulver in PBS  |

### 2.2.6 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit dem R Software Paket (<http://www.r-project.org>) durchgeführt. Um den multiallelischen TDT (mTDT) durchzuführen, wurde das Software Paket *gap* benutzt, das sich auf Sham (1997) bezieht. Der mTDT wurde benutzt um die Assoziation der Haplotypen zu bestimmen. Der biallelische TDT wurde wie bei Spielman *et al.* (1996) beschrieben durchgeführt. Die Haplotypphasen in den zu untersuchenden Familien wurden mittels Familiengenotypen aufgelöst. Verbleibende Mehrdeutigkeiten konnten vollständig eliminiert werden, indem nur Haplotypen erlaubt wurden, die in einem Deletionspatientenkollektiv vorkamen. Alle 2 x 2 Kontingenz Tafeln wurden mit dem Fisher's Exact Test getestet. 3 x 2 Kontingenztafeln wurden mit dem Pearson's  $\chi^2$  Test beurteilt. Alle Loci wurden einem *goodness-of-fit* Test für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) unterzogen. Kein Locus zeigte eine Abweichung vom HWG ( $P > 0,4$ ).

Die Haplotyp-Blockstruktur wurde mit Hilfe der Software Haploview (Barrett *et al.*, 2005) untersucht. Paarweises Kopplungsungleichgewicht zwischen den Polymorphismen wird als  $D'$  (ein normalisierter Wert, um die Stärke des Kopplungsungleichgewichts zu beurteilen) ausgedrückt. Haplotyp-Blöcke wurden mit dem 4-Gameten Regel Algorithmus berechnet.

Die Beziehung zwischen den Haplotypen des AS-SRO und den Haplotypen des PWS-SRO wurde mit dem Median Joining Algorithmus (Bandelt *et al.*, 1999) bestimmt, wofür die Software Network 4.1.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) benutzt wurde.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung von *Cis*-Faktoren, die möglicherweise das Risiko von Epimutationen auf dem Chromosom 15 modifizieren

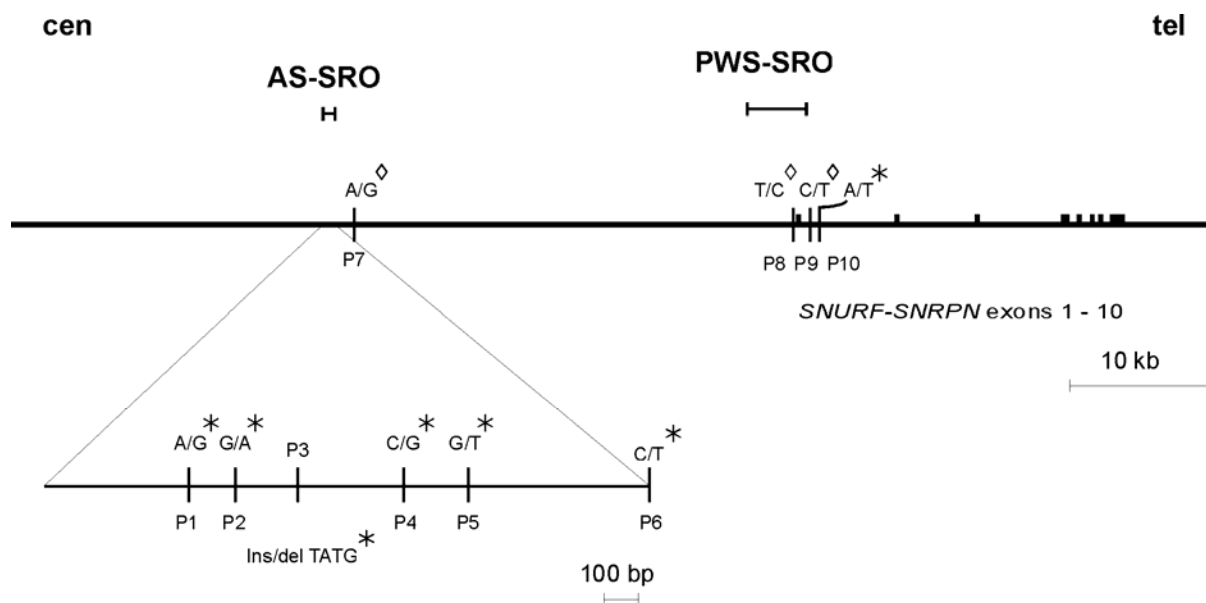
Etwa 1% der Patienten mit PWS und 4% der Patienten mit AS haben einen Imprinting Defekt (ID). Die Patienten haben scheinbar normale Chromosomen 15 biparentaler Herkunft, jedoch weist das paternale Chromosom bei Patienten mit PWS eine maternale Prägung auf, wohingegen das maternale Chromosom bei Patienten mit AS eine paternale Prägung aufweist. Bei 10 – 15% der Patienten wird der Imprinting Defekt durch eine Deletion im Imprinting Center verursacht (IC) (Buiting *et al.*, 1995). In der Mehrzahl der Patienten mit einem Imprinting Defekt, ist der Defekt jedoch eine primäre Epimutation, die spontan in Abwesenheit von DNA Sequenzveränderungen auftritt (Buiting *et al.*, 2003).

##### 3.1.1 Sequenzvarianten im Imprinting Center

Das Imprinting Center besteht aus zwei kritischen Elementen, dem AS-SRO und dem PWS-SRO, und reguliert in *cis* die DNA Methylierung, die Genexpression und die Chromatinstruktur der geprägten Region 15q11-q13. Der PWS-SRO wird für die post-zygotische Aufrechterhaltung des väterlichen Imprints im frühen Embryo benötigt (Bielinska *et al.*, 2000; El-Maarri *et al.*, 2001). Der AS-SRO interagiert möglicherweise mit dem PWS-SRO um den mütterlichen Imprint in der weiblichen Keimbahn zu etablieren (Dittrich *et al.*, 1996; Shemer *et al.*, 2000; Perk *et al.*, 2002). Die molekularen Mechanismen sind unbekannt, aber es sind möglicherweise *Trans*-Faktoren involviert, die an den AS-SRO und den PWS-SRO binden (Kantor *et al.*, 2004a; Kantor *et al.*, 2004b). Daher ist es möglich, dass es DNA Sequenzvarianten in den Protein-Bindestellen gibt, die die Bindung von *Trans*-Faktoren und somit den epigenetischen Status der chromosomalen Domäne beeinflussen.

In vorhergehenden Studien in unserem Labor wurden durch Sequenzanalysen des AS-SRO vier SNPs (*single nucleotide polymorphism*) und eine 4-bp große Insertion/Deletion im AS-SRO (P1, rs2075814; P2, rs2736711; P3, rs36061418; P4, rs35207533; P5, rs17114852) sowie ein SNP 9 bp distal des AS-SRO (P6, rs17785249) identifiziert. Der PWS-SRO ist wenig polymorph, jedoch wurden zwei SNPs im Intron 1, direkt distal des PWS-SRO identifiziert, P9 (rs220028) und P10 (rs4906940) (Buiting *et al.*, 2003; Buiting *et al.*, 1998b). P9 ist schon als *MspI* Polymorphismus beschrieben worden (Buiting *et al.*, 1998b). Mittels

Datenbanksuche wurden zwei weitere Polymorphismen identifiziert: ein SNP 1,4 kb distal des AS-SRO (P7, rs2355600) und ein SNP im PWS-SRO, 367 bp stromaufwärts des Exon 1 von *SNURF-SNRPN* (P8, rs220030). Die Lage der zehn Polymorphismen ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

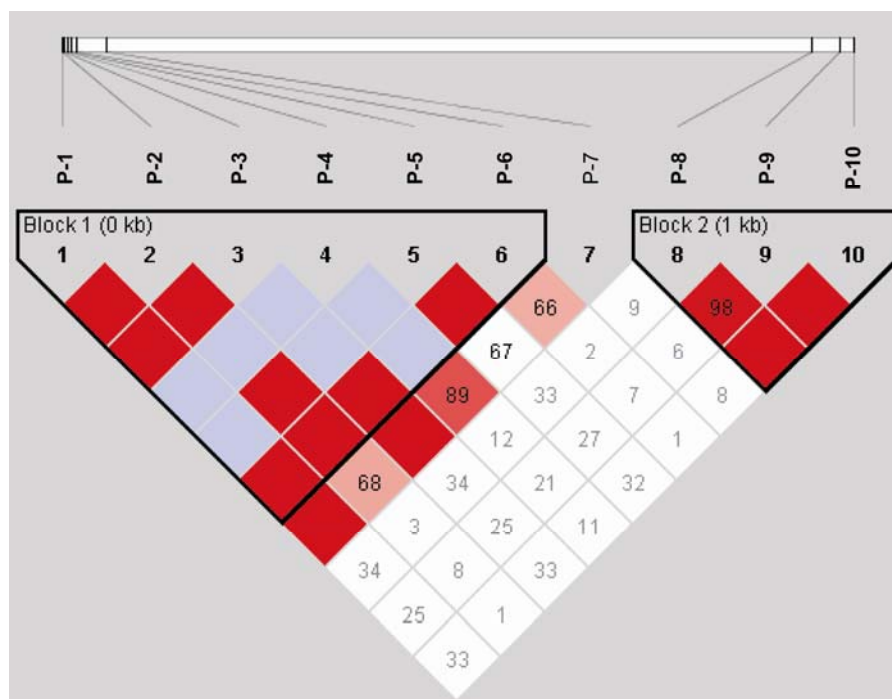


**Abb. 3.1:** Übersicht über die IC Region. Die Position der Polymorphismen ist durch vertikale Linien dargestellt. Im Text werden sie als P1 – P10 bezeichnet (vom Centromer zum Telomer). Schwarze Boxen kennzeichnen die *SNURF-SNRPN* Exons. Polymorphismen, die mit Assays-by-Design analysiert wurden, sind mit einer Raute gekennzeichnet. Polymorphismen, die durch Sequenzanalyse analysiert wurden, sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.

### 3.1.2 Analyse der Haplotypstruktur des Imprinting Centers

Als erstes habe ich die Haplotypstruktur der IC Region bestimmt. Da Patienten mit AS bzw. PWS und einer großen *de novo* Deletion des Bereichs 15q11-q13 nur eine Kopie dieser Region haben, konnten die Haplotypen experimentell bestimmt werden. Um die Anzahl der Haplotypen zu erhöhen wurde zusätzlich der nicht-transmittierte Haplotyp der Eltern bestimmt. Dazu wurde der Haplotyp von PWS Deletions-Patienten mit dem Genotyp der Mutter und der Haplotyp von AS Deletions-Patienten mit dem Genotyp des Vaters verglichen. Die zehn Polymorphismen wurden in 110 Patienten mit PWS und 16 Müttern und in 71 Patienten mit AS und 65 Vätern analysiert. Somit erhielt man insgesamt 262 Haplotypen.

Mittels der Software Haploview wurden zwei Bereiche (Haplotyp-Blöcke) identifiziert, die ein Kopplungsungleichgewicht aufweisen (Abb. 3.2). Ein Haplotyp-Block umfasst die Polymorphismen P1 – P6, der andere umspannt die Polymorphismen P8 – P10. Der Polymorphismus P7 liegt zwischen den beiden Blöcken. Zusätzlich wurden noch die Daten des International Hap Map Projektes analysiert. Von den zehn Polymorphismen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind die Polymorphismen P1, P2, P5, P6, P7, P8 und P9 im Hap Map Projekt untersucht worden. Auch die Hap Map Daten zeigen, dass der PWS-SRO und der AS-SRO auf verschiedenen Haplotyp-Blöcken liegen (ohne Abbildung). Daher wurden die beiden IC Elemente separat analysiert.



**Abb. 3.2:** Haplotyp Struktur des IC. Jedes Quadrat repräsentiert einen paarweisen Vergleich zwischen zwei Polymorphismen (P1 – P10). Die Werte für  $D'$  ( $\times 100$ ) sind in den Quadranten angegeben. Rote Quadrate kennzeichnen paarweise  $D'$ -Werte = 1 und ein statistisch signifikantes Kopplungsungleichgewicht zwischen den beiden Polymorphismen. Blaue Quadrate kennzeichnen auch paarweise  $D'$ -Werte = 1, aber ohne statistische Signifikanz. Hellrote, rosa und weiße Quadrate kennzeichnen paarweise  $D'$ -Werte  $< 1$ , hellrote und rosa mit statistischer Signifikanz, und weiße Quadrate ohne statistische Signifikanz. Die zwei Haplotyp-Blöcke sind als dreieckige Regionen gekennzeichnet.

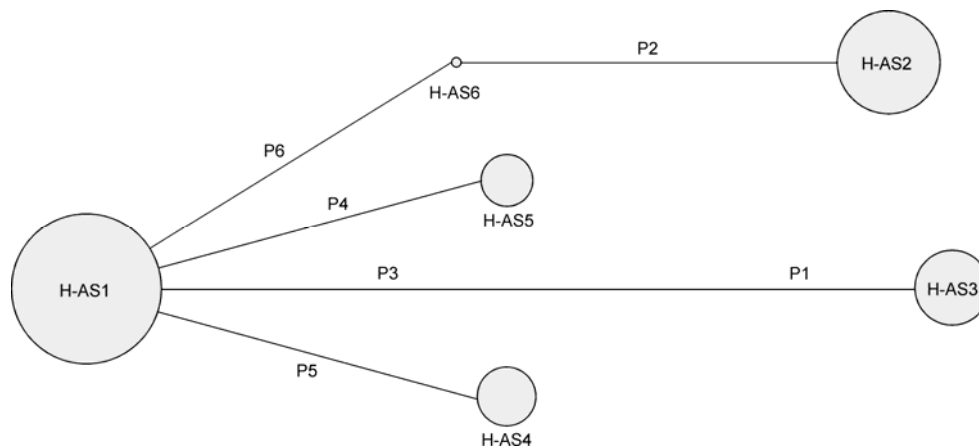
### 3.1.3 Die Haplotypen des AS-SRO

Für den AS-SRO wurden sechs unterschiedliche Haplotypen identifiziert (Tabelle 3.1). Ein Haplotyp (H-AS1) ist relativ häufig und wurde in 49% der Fälle gefunden. Der nächst häufigere Haplotyp (H-AS2) kommt in 23% der Fälle vor. Drei Haplotypen sind relativ selten (H-AS3, H-AS4 und H-AS5) und ein Haplotyp wurde nur ein Mal gefunden (H-AS6).

**Tabelle 3.1:** Haplotypen des AS-SRO

| Haplotypen | P1 | P2 | P3   | P4 | P5 | P6 | Anzahl | Frequenz [%] |
|------------|----|----|------|----|----|----|--------|--------------|
| H-AS1      | A  | G  | TATG | C  | G  | C  | 129    | 49,2         |
| H-AS2      | A  | A  | TATG | C  | G  | T  | 61     | 23,3         |
| H-AS3      | G  | G  | del  | C  | G  | C  | 34     | 13,0         |
| H-AS4      | A  | G  | TATG | C  | T  | C  | 21     | 8,0          |
| H-AS5      | A  | G  | TATG | G  | G  | C  | 16     | 6,1          |
| H-AS6      | A  | G  | TATG | C  | G  | T  | 1      | 0,4          |
| gesamt     |    |    |      |    |    |    | 262    |              |

Um die Beziehung der Haplotypen zu untersuchen wurde der Median Joining Algorithmus benutzt (Abb. 3.3). Die zweit- und dritthäufigsten Haplotypen H-AS2 und H-AS3 unterscheiden sich in zwei Polymorphismen vom häufigsten Haplotyp. Die drei seltenen Haplotypen H-AS4, H-AS5 und H-AS6 unterscheiden sich nur in einem Polymorphismus von dem Haplotyp H-AS1.



**Abb. 3.3:** Netzwerk der Haplotypen des AS-SRO. Jeder Kreis repräsentiert einen Haplotyp. Die Fläche jedes Kreises ist proportional zur Frequenz des Haplotyps. Die Polymorphismen in denen sich die Haplotypen unterscheiden sind an den Verbindungslinien angegeben.

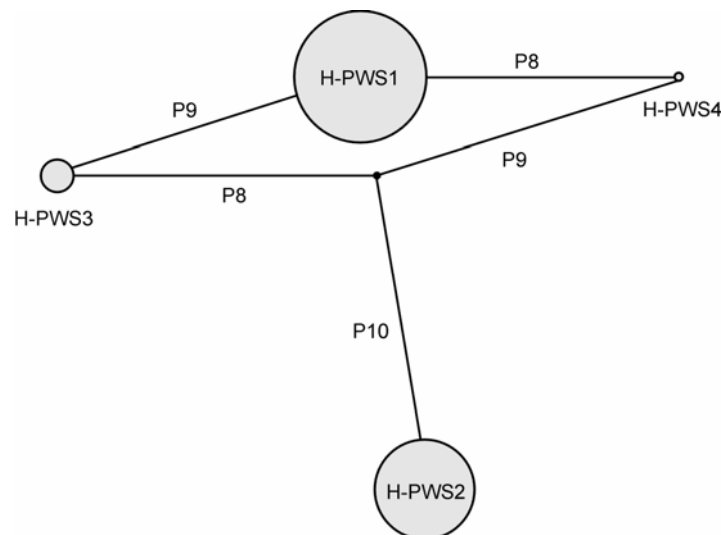
### 3.1.4 Die Haplotypen des PWS-SRO

Für den PWS-SRO wurden vier unterschiedliche Haplotypen identifiziert (Tabelle 3.2), zwei häufige und zwei seltene. Die beiden häufigen Haplotypen H-PWS1 und H-PWS2 traten mit einer Häufigkeit von 60% bzw. von 35% auf. Die beiden seltenen Haplotypen H-PWS3 und H-PWS4 wurden in 4% bzw. 0,4% der Fälle gefunden.

**Tabelle 3.2:** Haplotypen des PWS-SRO

| Haplotypen | P8 | P9 | P10 | Anzahl | Frequenz [%] |
|------------|----|----|-----|--------|--------------|
| H-PWS1     | T  | C  | A   | 158    | 60,3         |
| H-PWS2     | C  | T  | T   | 92     | 35,1         |
| H-PWS3     | T  | T  | A   | 11     | 4,2          |
| H-PWS4     | C  | C  | A   | 1      | 0,4          |
| gesamt     |    |    |     | 262    |              |

Die beiden häufigen Haplotypen unterscheiden sich in allen drei Polymorphismen. Die beiden seltenen Polymorphismen unterscheiden sich nur in einem Polymorphismus vom häufigsten Haplotyp (Abbildung 3.4).



**Abb. 3.4:** Netzwerk der Haplotypen des PWS-SRO. Jeder Kreis repräsentiert einen Haplotyp. Die Fläche jedes Kreises ist proportional zur Frequenz des Haplotyps. Die Polymorphismen in denen sich die Haplotypen unterscheiden sind an den Verbindungslinien angegeben.

### 3.1.5 Assoziationsstudien der IC Sequenzvarianten

Um IC Sequenzvarianten, die mit einer genetischen Prädisposition für einen Imprinting Fehler assoziiert sind zu identifizieren, wurde eine Kohorte aus 48 AS-ID Trios (betroffenes Kind, Mutter, Vater) und 41 PWS-ID Trios genotypisiert. Um auf Assoziation zu testen wurde der Transmissions Disequilibrium Test (TDT) benutzt. Der TDT ist ein familienbasierter Assoziationstest mit dem bestimmt werden kann, wie häufig ein bestimmtes Allel oder Haplotyp von einem heterozygoten Elternteil an ein betroffenes Kind weitergegeben wird, d. h. es wird die Transmissionsrate eines prädisponierenden Allels untersucht. Wird ein Allel

überzufällig häufig, d. h. in mehr als 50% der Fälle an das betroffene Kind weitergegeben, so würde man erwarten, dass dieses Allel krankheitsverursachend ist. Ein Vorteil des TDT ist, dass er unabhängig von der Populationsstruktur ist, was wichtig für diese Studie ist, da die Familien weltweit rekrutiert worden sind. Weiterhin berücksichtigt ein familienbasierter Test, ob der betroffene Haplotyp vom Vater oder von der Mutter vererbt wird. Für die Haplotypen wurde ein biallelischer TDT benutzt, für die einzelnen Polymorphismen und Kombinationen der Polymorphismen ein multiallelischer TDT. Bei den PWS-ID Trios wurde keine präferentielle Transmission eines Allels oder eines Haplotyps beobachtet. Bei den AS-ID Trios wurde der Haplotyp H-AS3 häufiger als erwartet von den Müttern weitergegeben ( $P = 0,058$ ); (Tabelle 3.3). Der multiallelische TDT zeigte einen Trend für eine erhöhte Transmission des G Allels des Polymorphismus P1 und des 4bp Deletions Allels des Insertions-Deletions Polymorphismus P3 ( $P = 0,058$ ); (Tabelle 3.4). Weiterhin wurden signifikante  $P$ -Werte ( $P = 0,021$ ) für drei Kombinationen der Polymorphismen P1, P3 und P4 gefunden (Tabelle 3.4). Das G Allel des Polymorphismus P1, das 4bp Deletions Allel des Polymorphismus P3 und das C Allel des Polymorphismus P4 wurden überzufällig häufig weitergegeben. Interessanterweise sind das G Allel des Polymorphismus P1 und das 4bp Deletions Allel des Polymorphismus P3 nur im Haplotyp H-AS3 vorhanden. Auch im Schimpansen, Gorilla, Orang-Utan, Makaken, Pavian und Wollaffen (Robert Nicholls und Kentaro Yamasaki, persönliche Mitteilung) konnten diese Allele nicht gefunden werden. In den Patienten mit AS wurden nur zwei seltene Varianten im AS-SRO in je einem Patienten gefunden, die beide im Haplotyp H-AS1 vorkommen. Eine Variante (eine T Insertion bp 6525-6526 (Buiting *et al.*, 2003)) wurde vom Vater des Patienten vererbt. Die andere (6048 C/G [GenBank accession number AF148319]) wurde von der Mutter des Patienten vererbt.

**Tabelle 3.3:** Ergebnisse des biallelischen TDT

| Haplotypen des AS-SRO in AS-ID Patienten | $P$ -Werte der maternalen Transmission | Frequenzen der transmittierten Haplotypen | $P$ -Werte der paternalen Transmission | Frequenzen der transmittierten Haplotypen |
|--|--|---|--|---|
| H-AS1                                    | 0,513                                  | 0,429                                     | 0,67                                   | 0,45                                      |
| H-AS2                                    | 0,225                                  | 0,353                                     | 0,527                                  | 0,4                                       |
| H-AS3                                    | 0,058                                  | 0,8                                       | 0,739                                  | 0,44                                      |
| H-AS4                                    | 0,706                                  | 0,429                                     | 0,317                                  | 0,67                                      |
| H-AS5                                    | 0,18                                   | 0,8                                       | 0,317                                  | 0,67                                      |
| H-AS6                                    | nicht beobachtet                       | nicht beobachtet                          | 0,317                                  | 0,67                                      |

**Tabelle 3.4:** Ergebnisse des multiallelischen TDT

| Polymorphismen des AS-SRO<br>in AS-ID Patienten | P-Werte der<br>maternalen<br>Transmission | $\chi^2$ der<br>maternalen<br>Transmission | Freiheitsgrade |
|---|---|--|----------------|
| P1  | 0,058                                     | 3,6  | 1              |
| P2  | 0,197                                     | 1,67                                       | 1              |
| P3  | 0,058                                     | 3,6  | 1              |
| P4  | 0,18                                      | 1,8  | 1              |
| P5  | 0,706                                     | 0,14                                       | 1              |
| P6  | 0,197                                     | 1,67                                       | 1              |
| P1/P3   | 0,058                                     | 3,6  | 1              |
| P1/P4   | 0,021                                     | 7,75                                       | 2              |
| P3/P4   | 0,021                                     | 7,75                                       | 2              |
| P1/P3/P4  | 0,021                                     | 7,75                                       | 2              |

### 3.2 Analyse von indirekten *Trans*-Faktoren, die möglicherweise das Risiko von Epimutationen auf dem Chromosom 15 modifizieren

Es ist möglich, dass die spontane Epimutationsrate auch durch *Trans*-Faktoren modifiziert wird. Direkte *Trans*-Faktoren, die an den AS-SRO oder den PWS-SRO binden, sind bisher nicht bekannt, aber ein guter Kandidat für einen indirekten *Trans*-Faktor ist das 5,10-Methylentetrahydrofolat Reduktase (*MTHFR*) Gen. *MTHFR* spielt eine wichtige Rolle im Folat-Metabolismus, bei der DNA Methylierung und bei der DNA Synthese. *MTHFR* katalysiert die Reduktion von 5,10-Methylentetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat, welches wiederum von der Methionin Synthase für die Methylierung von Homocystein zu Methionin genutzt wird. Methionin ist der Vorläufer des S-Adenosyl-L-Methionins (SAM), das als Methyl-Donor für DNA und Histon Methyltransferasen dient. Eine 677C>T Transition im *MTHFR* Gen führt zu einem thermolabilen Protein mit reduzierter enzymatischer Aktivität (Frosst *et al.*, 1995). Veränderungen in der *MTHFR* Aktivität beeinflussen den Level von SAM und verschiedene Studien haben gezeigt, dass Homozygotie für das T Allel mit einer globalen genomischen DNA Hypomethylierung assoziiert ist (Friso *et al.*, 2002; Stern *et al.*, 2000; Paz *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2004). Obwohl Imprints gegen globale Änderungen der DNA Methylierung geschützt zu sein scheinen (Morgan *et al.*, 2005), ist es möglich, dass reduzierte Level von SAM in den weiblichen Keimzellen das Risiko für eine fehlende oder unvollständige Etablierung des mütterlichen Methylierungsprints erhöhen könnten.

Um zu untersuchen, ob eine Homozygotie des *MTHFR* 677T Allels die Etablierung des maternalen Imprints beeinflusst, habe ich 52 Mütter von Patienten mit AS und einem

Imprinting Defekt genotypisiert. Da die Trios weltweit rekrutiert wurden, wurden die Väter als Kontrollen benutzt, da sie mit hoher Wahrscheinlichkeit zur selben ethnischen Gruppe wie die Mütter gehören. Die Verteilung der Genotypen von 52 Müttern und 50 Vätern von Patienten mit AS und einem Imprinting Defekt ist in Tabelle 3.5 dargestellt. Mittels des Fisher's Exact Test konnte gezeigt werden, dass die Frequenz des 677TT Genotyps in Müttern signifikant erhöht ist ( $P = 0,028$ ). Das Odds Ratio beträgt 5,71 mit einem 95% Konfidenz Interval (KI) von 1,18 – 27,56 (Pearson's  $\chi^2$  für eine 3 x 2 Kontingenztabelle:  $\chi^2 = 7,76$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0,021$ ). Man kann die Genotypen der Väter nur als Kontrolle nutzen, wenn der paternale Genotyp nicht das Risiko einer Epimutation auf dem maternalen Allel beeinflusst. Obwohl dieses Szenario unwahrscheinlich ist, wurden Odds Ratio und  $P$ -Wert mit den Genotyp Frequenzen, die von van der Put *et al.* (1998) bestimmt wurden, berechnet. Die Genotyp Frequenzen in dieser Population sind ähnlich zu den Frequenzen der Väter, die in dieser Studie benutzt wurden. Mit diesen Daten wurde ein Odds Ratio von 2,43 mit einem 95% KI von 1,12 – 5,24 und einem  $P$ -Wert von 0,028 (Pearson's  $\chi^2$  für eine 3 x 2 Kontingenztabelle:  $\chi^2 = 6,94$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0,031$ ) erhalten.

**Tabelle 3.5:** Verteilung der *MTHFR* Genotypen

| Gruppe | Genotyp | Anzahl | Frequenz [%] |
|--------|---------|--------|--------------|
| Mütter | CC      | 19     | 37           |
|        | CT      | 23     | 44           |
|        | TT      | 10     | 19           |
| Väter  | CC      | 29     | 58           |
|        | CT      | 19     | 38           |
|        | TT      | 2      | 4            |

### 3.3 Identifizierung von *Trans*-Faktoren, die an den AS-SRO binden

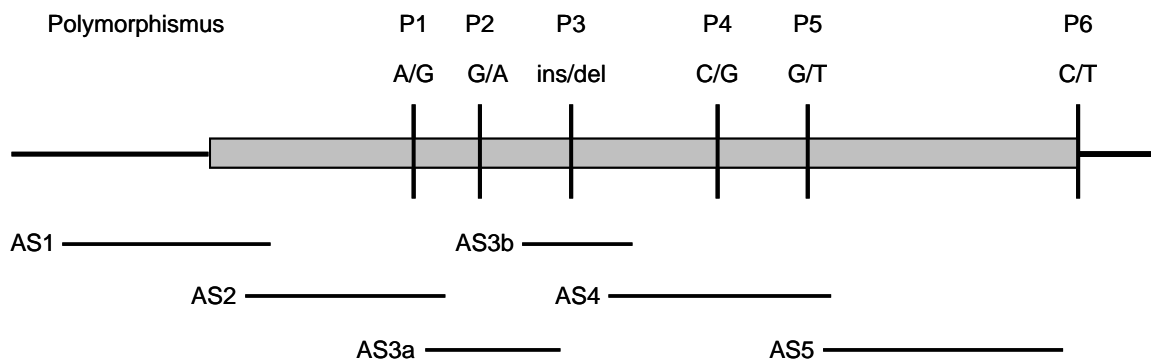
Der AS-SRO interagiert möglicherweise mit dem PWS-SRO, um den mütterlichen Imprint in der weiblichen Keimbahn zu etablieren (Dittrich *et al.*, 1996; Shemer *et al.*, 2000; Perk *et al.*, 2002). Dabei sind möglicherweise *Trans*-Faktoren involviert, die an den AS-SRO und den PWS-SRO binden (Kantor *et al.*, 2004a; Kantor *et al.*, 2004b). Um *Trans*-Faktoren zu identifizieren, die an den AS-SRO binden, wurde von Barbara Gärtner-Ruprecht (Kinderklinik Mainz) ein Yeast-One-Hybrid Screen mit einer menschlichen Ovar cDNA Bibliothek (Clontech) durchgeführt. Dazu wurden sechs überlappende Fragmente des AS-SRO (bp 5942 – 6822 [GenBank accession number AF148319]) benutzt (Tabelle 3.6 und Abb. 3.5).



**Tabelle 3.6:** Die Fragmente des AS-SRO mit ihren Positionen

| Fragment | Position       |
|----------|----------------|
| AS1      | bp 5791 - 6005 |
| AS2      | bp 5981 - 6187 |
| AS3a     | bp 6166 - 6305 |
| AS3b     | bp 6262 - 6375 |
| AS4      | bp 6354 - 6583 |
| AS5      | bp 6575 - 6822 |

Das Fragment AS2 beinhaltet den Polymorphismus P1, das Fragment AS3b den Polymorphismus P3. Der Screen wurde mit dem A Allel des Polymorphismus P1 und dem 4 bp Insertions Allel des Polymorphismus P3 durchgeführt. Diese Allele sind nicht mit einem erhöhten Risiko für einen Imprinting Defekt assoziiert.

**Abb. 3.5:** Überblick über den AS-SRO mit den sechs Polymorphismen und den Fragmenten, die beim Yeast-One-Hybrid Screen verwendet wurden. Nicht maßstabsgetreu.

Für das Fragment AS1 wurden insgesamt 45 Klone gefunden, für das Fragment AS2 24, für das Fragment AS3a 35, für das Fragment AS3b 33, für das Fragment AS4 7 und für das Fragment AS5 4 Klone. Die Verifizierung dieser Klone erfolgte durch die im Folgenden beschriebenen Standardverfahren. Zunächst wurden die spezifischen Interaktionen in einem *reverse-one-hybrid* Experiment überprüft. Dazu erfolgten Retransformationen eines Hefe-LacZ-Stammes, mit identischen AS-SRO Subfragmenten und anderen Promoter- und Reporterelementen. Die DNA Bindekapazität wurde über  $\beta$ -Gal Expression mittels Filter Lift Assays ausgetestet. Da die Fragmente AS2 und AS3b die Polymorphismen P1 und P3 enthalten, haben wir uns auf die cDNA Klone, die für diese Fragmente gefunden wurden, konzentriert. Für das AS2 Fragment konnten fünf putative Binde faktoren verifiziert werden.

Dieses sind TIEG1 (TGF $\beta$ -inducible early gene 1), Nucleoporin 98, eine Seryl t-RNA Synthetase, eine Phospholipase C-like 2 und die cDNA FLJ12918. Für das AS3b Fragment konnten 2 Klone verifiziert werden, CystatinC und die cDNA FLJ 12357. Von diesen Klonen schien TIEG1 ein viel versprechender Kandidat zu sein. Für TIEG1 wurden drei verschiedene cDNA Klone, die unterschiedliche Bereiche des *TIEG1* Gens repräsentieren, identifiziert.

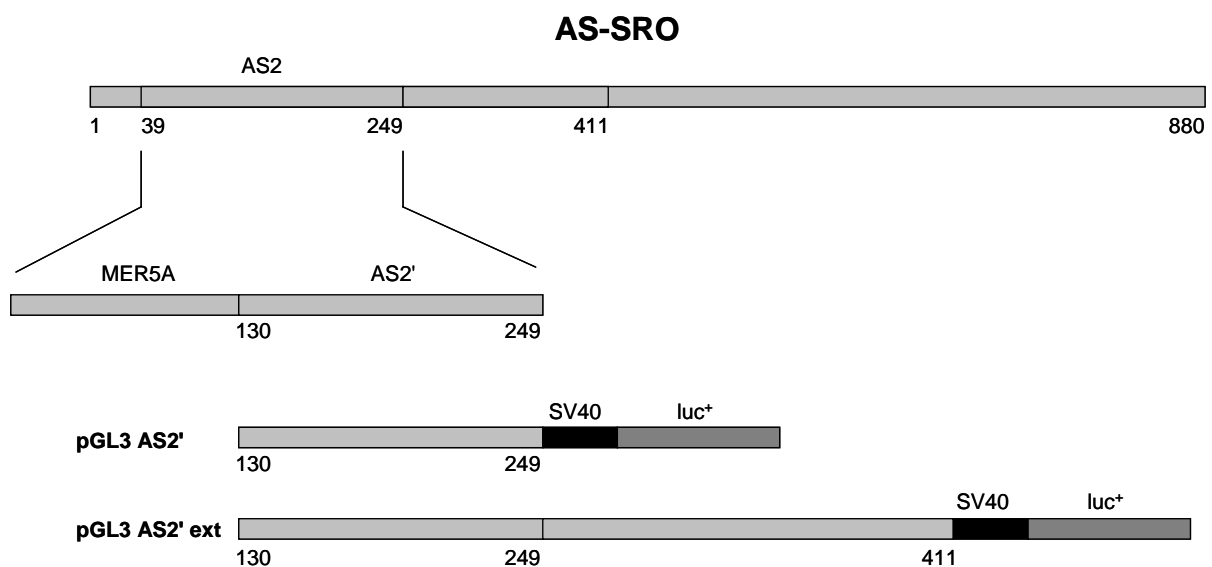
TIEG1 wurde ursprünglich in menschlichen Osteoblasten nach einer TGF $\beta$  Behandlung identifiziert (Subramaniam *et al.*, 1995). Es gehört zur Familie der Sp1-ähnlichen/KLF (Specificity Protein 1/Krüppel-like Factor) Transkriptionsfaktoren und besteht aus 480 Aminosäuren. Am C-Terminus enthält TIEG1 drei Sp1-ähnliche Zink-Finger DNA-Bindedomänen und am N-Terminus drei Repressions-Domänen (Subramaniam *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1999). *TIEG1* wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. Northern Blot Analysen zeigen hohe *TIEG1* mRNA Level in peripheren Leukozyten, in der Milz und im Dickdarm und niedrigere Level im Thymus, im Dünndarm, in den Ovarien und in der Prostata (Fautsch *et al.*, 1998). Zudem wurde eine hohe Expression von *TIEG1* in verschiedenen Muskeltypen, mit der höchsten Expression im Skelettmuskel, nachgewiesen (Subramaniam *et al.*, 1995; Fautsch *et al.*, 1998). Für TIEG1 sind unterschiedliche Funktionen bekannt. Es spielt eine wichtige Rolle im TGF $\beta$ /Smad Signaltransduktionsweg, bei der Zelldifferenzierung und Zellproliferation und bei der Apoptose (Tachibana *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 1998, Johnsen *et al.*, 2002a; Johnsen *et al.*, 2002b; Johnsen *et al.*, 2002c). Zudem haben verschiedene Studien gezeigt, dass TIEG1 als Transkriptionsrepressor wirkt, indem es an CG-reiche/Sp1-ähnliche DNA-Sequenzen bindet (Cook *et al.*, 1999, Tanabe *et al.*, 2002).

Die Funktion von TIEG1 als Transkriptionsrepressor passt zu der von uns vorgeschlagenen Modellvorstellung, dass in der weiblichen Keimbahn ein *Trans*-Faktor, der als Repressor agiert, an den AS-SRO bindet und das *SNURF-SNRPN* Gen stilllegt. Im Anschluss kommt es zu einer *de novo* Methylierung des PWS-SRO und zur Inaktivierung aller weiteren geprägten Gene auf dem maternalen Chromosom. Die Rolle, die TIEG1 beim maternalen Imprinting spielen könnte, sollte daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

### 3.3.1 Analyse des Effektes von TIEG1 auf den AS-SRO

Um eine reprimierende Wirkung von TIEG1 auf das IC in 15q11-q13 zu untersuchen, habe ich Luciferase-Reporter Assays mit dem Fragment AS2 durchgeführt. AS2 enthält ein repetitives Element, ein MER5A Repeat (bp 5904 – 6067 [GenBank accession number AF148319]). Für die Luciferase-Reporter Experimente wurde das AS2 Fragment ohne das

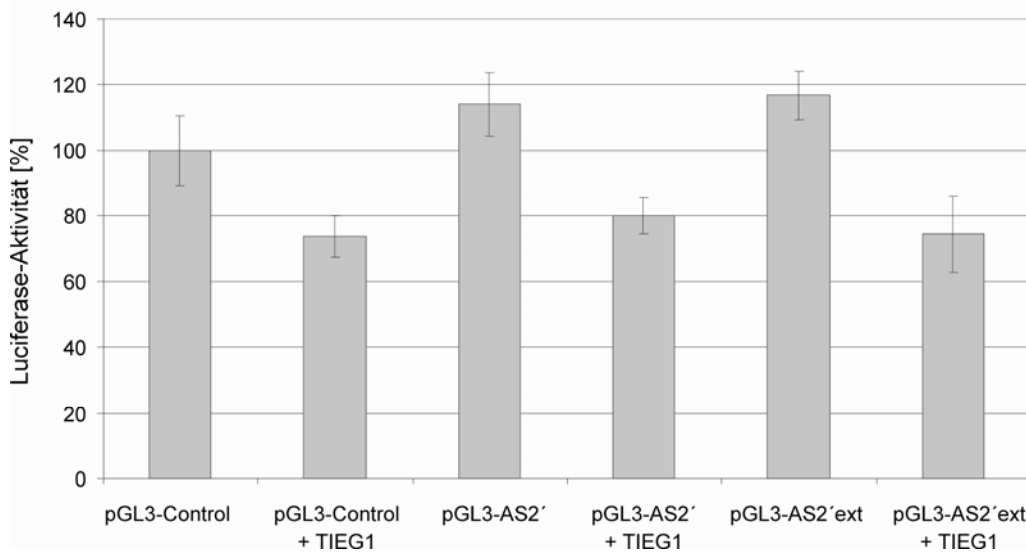
MER5A Repeat in den Reporter Vektor pGL3-Control ligiert, und zwar 5' des SV40 Promoters (Abb. 3.6). Das Konstrukt wird im Folgenden als pGL3-AS2' bezeichnet. Da zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt war, an welcher Position TIEG1 genau bindet (siehe auch 3.3.2) sollten sterische Effekte ausgeschlossen werden und ein Spacer zwischen das AS2' Fragment und den SV40 Promoter integriert werden. Dazu wurden 162 bp der Sequenz 3' des AS2' Fragments verwendet (pGL3-AS2'ext) (Abb. 3.6). Die cDNA der kodierenden Region für TIEG1 wurde durch PCR an einer humanen Testis cDNA amplifiziert und zunächst in das Plasmid pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> inseriert. Aus einem Klon, der die cDNA in der richtigen Orientierung enthielt wurde diese mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *HindIII* herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pcDNA3 inseriert.



**Abb. 3.6:** Schematische Darstellung der Konstrukte für die Luciferase-Reporter Assays.

Es folgte eine transiente Transfektion von CHO-K1 Zellen. Dazu wurden 100 ng der entsprechenden Reporterkonstrukte (pGL3-Control, pGL3-AS2' oder pGL3-AS2'ext) und 300 ng des für TIEG1 kodierenden Plasmids eingesetzt, sowie zur Normalisierung der Transfektionseffizienz 10 ng des pGL4.74[*hRluc*/TK] Vektors. Die Luciferase-Aktivität ist als Quotient aus der Firefly Luciferase-Aktivität und der Renilla Luciferase-Aktivität dargestellt. Die Luciferase-Aktivität der Zellen, die mit dem pGL3-Control Vektor transfiziert waren, wurde als Referenzwert (100%) definiert (Abb. 3.7). Zellen, die zusätzlich mit TIEG1 transfiziert wurden, zeigen eine deutlich reduzierte Luciferase-Aktivität. Der Grad der Repression der Luciferase-Aktivität der pGL3-AS2' und pGL3-AS2'ext Konstrukte, der beobachtet wurde, wenn die Zellen mit TIEG1 co-transfiziert wurden, liegt jedoch im

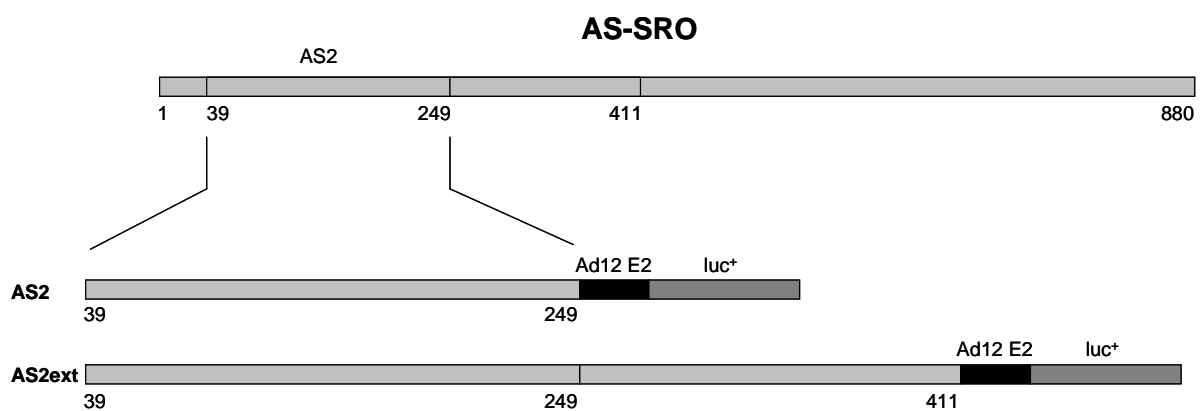
ähnlichen Bereich wie beim pGL3-Control Vektor. Das bedeutet, die Repression spiegelt wahrscheinlich nur den Einfluss von TIEG1 auf den SV40 Promoter wider. Der Grund dafür sind vermutlich mehrere Sp1-Bindestellen innerhalb dieses Promoters. Cook *et al.* (1999) haben gezeigt, dass TIEG1 an GC-reiche Sp1-ähnliche *cis*-regulatorische Sequenzen bindet und Promotoren, die GC-reiche Sequenzen enthalten reprimiert. Falls TIEG1 nur eine geringe reprimierende Wirkung durch Bindung an das AS2 Fragment ausübt, könnte der Effekt durch die direkte, starke Repression des SV40 Promoters überdeckt werden.



**Abb. 3.7:** Luciferase Aktivitäten des pGL3 Control Vektors und der Konstrukte pGL3-AS2' und pGL3-AS2'ext ohne und mit Co-Transfektion von TIEG1. Es wurden sechsfach Messungen durchgeführt und die Standardabweichung berechnet.

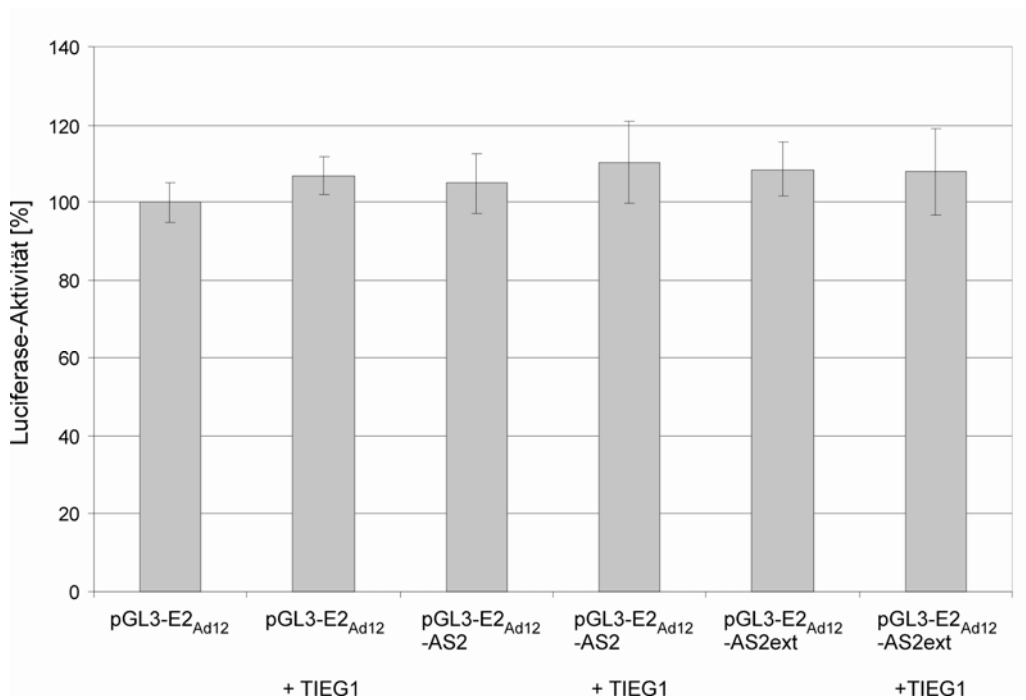
Um eine Bindung von TIEG1 an den Promoter des Luciferase-Vektors auszuschließen, wurden Reporter-Konstrukte mit Promotoren, die keine Sp1-Bindestelle besitzen, hergestellt. Dafür wurden ein E2 (early region) Promoter-Fragment des Adenovirus Serotyp 12 (Ad12) und ein ACE2 (angiotensin converting enzyme 2) Promoter-Fragment verwendet. Das Ad12 E2 Promoter-Fragment wurde aus dem E2<sub>Ad12</sub> (140 bp)-CAT Konstrukt (Fax *et al.*, 2000) amplifiziert und enthält nur eine Sp1 Bindestelle. Das ACE2 Promoter-Fragment wurde aus dem ACE2 Promoter Deletionskonstrukt -202 (Senkel *et al.*, 2005; Fig. 5), amplifiziert und enthält keine Sp1 Bindestelle. Diese beiden Konstrukte wurden uns freundlicherweise von Prof. Esche aus dem Institut für Molekularbiologie und von Prof. Ryffel aus dem Institut für Zellbiologie am Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt. Das Ad12 E2 Promoter-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Hind*III in den pGL3-Basic Vektor, der keinen Promoter enthält, inseriert (pGL3-E2<sub>Ad12</sub>). Danach wurden die Fragmente

AS2 und AS2ext in die Restriktionsschnittstellen *Mlu*I und *Xho*I 5' des Promoters einkloniert (Abb. 3.8). Die Konstrukte wurden als pGL3-E2<sub>Ad12</sub>-AS2 und pGL3-E2<sub>Ad12</sub>-AS2ext bezeichnet. Da bei den vorherigen Experimenten kein Effekt von TIEG1 auf das AS2 Fragment beobachtet wurde, ist es auch möglich, dass die TIEG1 Bindestelle im MER5A Repeat liegt. Daher wurde diesmal das komplette AS2 Fragment mit dem MER5A Repeat verwendet. Auch im HSV-TK Promoter des pGL4.74[*hRluc*/TK] Vektors befinden sich mehrere Sp1-Bindestellen. Daher wurde der HSV-TK Promoter mit *Kpn*I und *Hind*III aus diesem Vektor herausgeschnitten und das ACE2 Promoter-Fragment in diese Schnittstellen inseriert (pGL4.74 [*hRluc*/ACE2]).



**Abb. 3.8:** Schematische Darstellung der Konstrukte für die Luciferase-Reportergen Assays mit den AS2 bzw. AS2ext Fragmenten 5' des Ad12 E2 Promoterfragments

Danach wurden CHO-K1 Zellen wie oben beschrieben mit diesen Konstrukten transient transfiziert. Die Luciferase-Aktivität von Zellen die mit dem pGL3-E2<sub>Ad12</sub> Konstrukt transfiziert waren, wurde als Referenzwert (100%) definiert (Abb. 3.9). Zellen, die mit diesem Konstrukt und mit TIEG1 co-transfiziert wurden, zeigen keine signifikante Änderung der Luciferase-Aktivität. Das bedeutet TIEG1 hat keinen Effekt auf das Ad12 E2 Promoter-Fragment. Jedoch kommt es mit den Konstrukten pGL3-E2<sub>Ad12</sub>-AS2 und pGL3-E2<sub>Ad12</sub>-AS2ext bei einer Co-Transfektion mit TIEG1 auch zu keiner signifikanten Änderung der Luciferase-Aktivität.

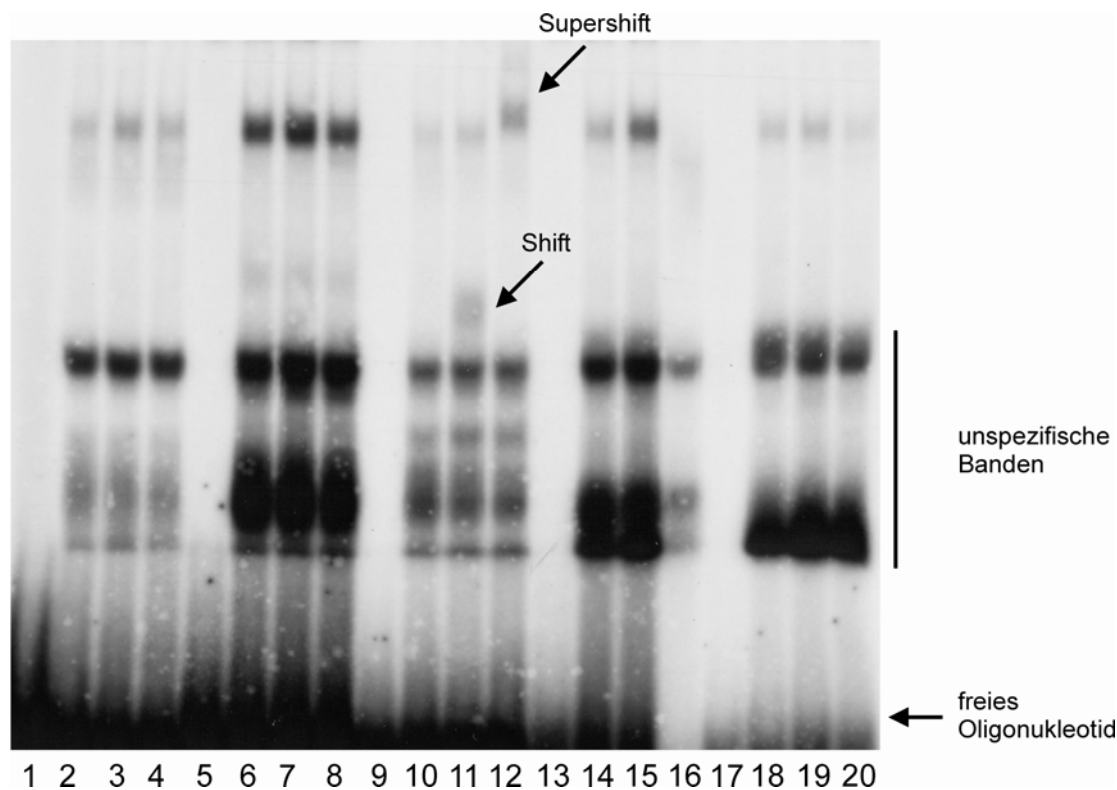


**Abb. 3.9:** Luciferase Aktivitäten der Konstrukte pGL3-E2<sub>Ad12</sub>, pGL3-E2<sub>Ad12</sub>-AS2 und pGL3-E2<sub>Ad12</sub>-AS2ext ohne Co-Transfektion von TIEG1 und mit Co-Transfektion von TIEG1. Es wurden sechsfach Messungen durchgeführt und die Standardabweichung berechnet.

### 3.3.2 Eingrenzung der Bindestelle von TIEG1 an den AS-SRO

Um die Bindung von TIEG1 an den AS-SRO in einem unabhängigen experimentellen System zu überprüfen und gegebenenfalls die Bindestelle einzugrenzen, wurde ein Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) durchgeführt. Dazu wurde die für TIEG1 codierende cDNA in den Vektor pCS2+MT integriert und TIEG1 als Fusionsprotein mit einem c-myc-tag durch *in vitro* Synthese mit dem TNT-Retikulozyten-Lysat (Promega) hergestellt. Die Expression von *TIEG1* wurde mittels Western Blot mit Hilfe eines Anti-c-Myc Antikörpers überprüft (ohne Abbildung). Es wurden insgesamt 13 doppelsträngige Oligonukleotide generiert, die das komplette AS2 Fragment überspannen (siehe Abb. 3.12). Die Oligonukleotide waren jeweils 30 bp lang und überlappten um 15 bp. TIEG1 wurde mit den 13 verschiedenen <sup>32</sup>P radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert. Die Ergebnisse für die Oligonukleotide 4 – 8 (ON-4 – ON-8) sind beispielhaft in Abbildung 3.10 dargestellt. Mit ON-6 konnte eine Bindung nachgewiesen werden, was an einem veränderten Migrationsverhalten des TIEG1-DNA Komplexes im Gel (Shift) zu erkennen ist (Abb. 3.10, Spur 11). Durch Zugabe eines Anti-c-Myc Antikörpers kam es zu einem Supershift, wodurch die Spezifität des TIEG1-DNA Komplexes bewiesen werden konnte (Spur 12). Als Kontrolle wurde das Oligonukleotide mit dem unprogrammierten TNT-Retikulozyten-Lysat (d. h. die *in vitro* Synthese-Reaktion

erfolgte mit dem leeren pCS2+MT Vektor ohne die cDNA von TIEG1) inkubiert (Spur 10). Es sind noch weitere Banden zu erkennen (Spuren 10 – 12), die jedoch auch in der Spur mit dem unprogrammierten TNT-Retikulozyten-Lysat auftauchen. Hierbei handelt es sich offensichtlich um unspezifische Banden. Der Supershift ist nicht ganz deutlich zu erkennen, da sich auf fast der gleichen Höhe eine weitere unspezifische Bande befindet. Für die Oligonukleotide ON-1 bis ON-5 und ON-7 bis ON-13 konnte keine Bindung von TIEG1 nachgewiesen werden.



**Abb. 3.10:** Autoradiogramm des Electrophoretic Mobility Shift Assays. Spuren 1-4: ON-4, Spuren 5-8: ON-5, Spuren 9-12: ON-6, Spuren 13-16: ON-7, Spuren 17-20: ON-8. In der jeweils ersten Spur ist nur das Oligonukleotid aufgetragen, in der jeweils zweiten Spur das Oligonukleotid mit dem unprogrammierten Retikulozyten-Lysat, in der jeweils dritten Spur das Oligonukleotid mit TIEG1 und in der jeweils vierten Spur das Oligonukleotid mit TIEG1 und dem Anti-c-Myc Antikörper.

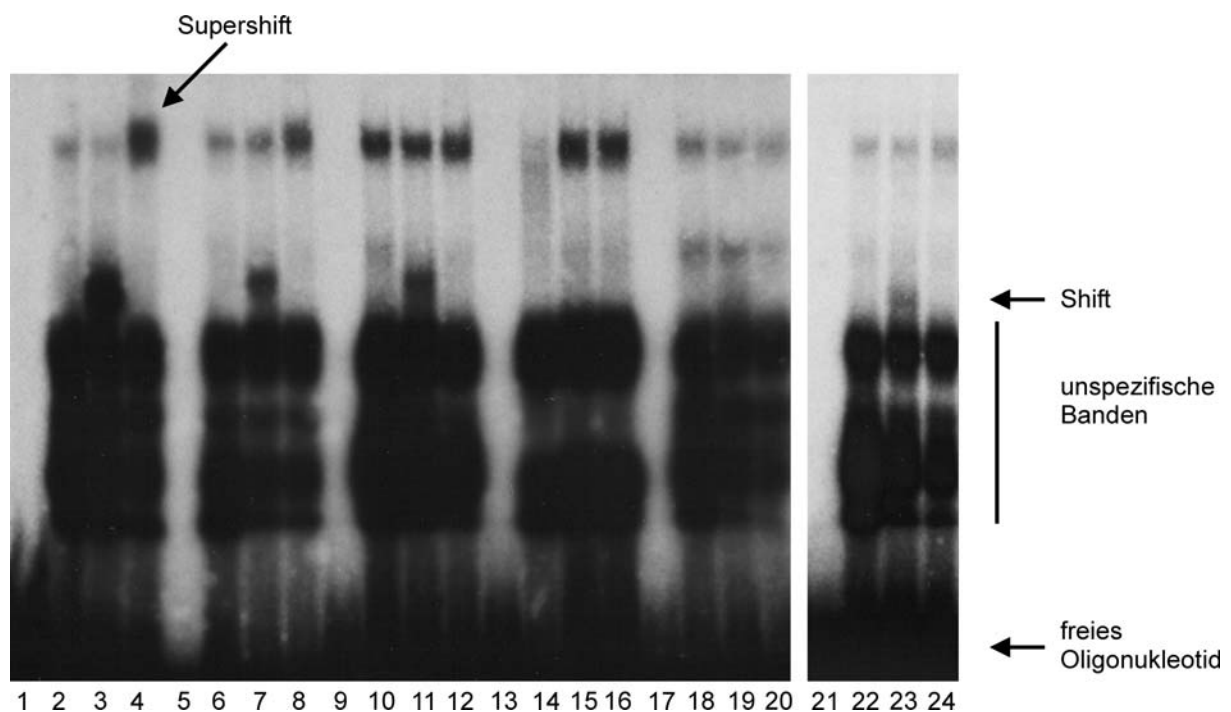
Um die Bindestelle von TIEG1 weiter einzugrenzen, wurde TIEG1 mit einer Reihe von mutierten Versionen des Oligonukleotids ON-6, welche jeweils 3 bp Substitutionen enthielten, inkubiert (Abb. 3.11A). Die sechs ersten und sechs letzten Nukleotide von ON-6 wurden nicht mutiert, da diese Nukleotide im mittleren Bereich der Oligonukleotide ON-5 und ON-7 liegen. Würde TIEG1 in diesem Bereich binden, hätte man mit ON-5 und ON-7 eine Bindung nachweisen müssen. Für ON-6.1, ON-6.2, ON-6.3 und ON-6.6 konnte eine Bindung von TIEG1 nachgewiesen werden (Abb. 3.11B). Das bedeutet die Basen, die in diesen Oligonukleotiden mutiert sind, sind nicht Teil der TIEG1 Core-Bindestelle. Der

Supershift, zu dem es durch die Zugabe des Anti-c-Myc Antikörpers kommt, ist allerdings nur bei ON-6.1 gut erkennbar. Jedoch ist der Shift des TIEG1-DNA Komplexes bei ON-6.1, ON-6.2 und ON-6.3 deutlich zu sehen. Bei ON-6.6 ist die Intensität der Bande schwächer, aber zu erkennen. Für ON-6.4 und ON-6.5 konnte keine Bindung von TIEG1 nachgewiesen werden. Die Nukleotide, die in diesen Oligonukleotiden mutiert sind, sind somit notwendig für die Bindung von TIEG1. Folglich konnte die TIEG1 Core-Bindestelle auf 6 bp (GTGGGA) eingegrenzt werden. Die Core-Bindestelle liegt nicht im MER5A Repeat, beinhaltet jedoch auch nicht den Polymorphismus P1 (Abb. 3.12; siehe auch Abschnitt 3.1.5).

A

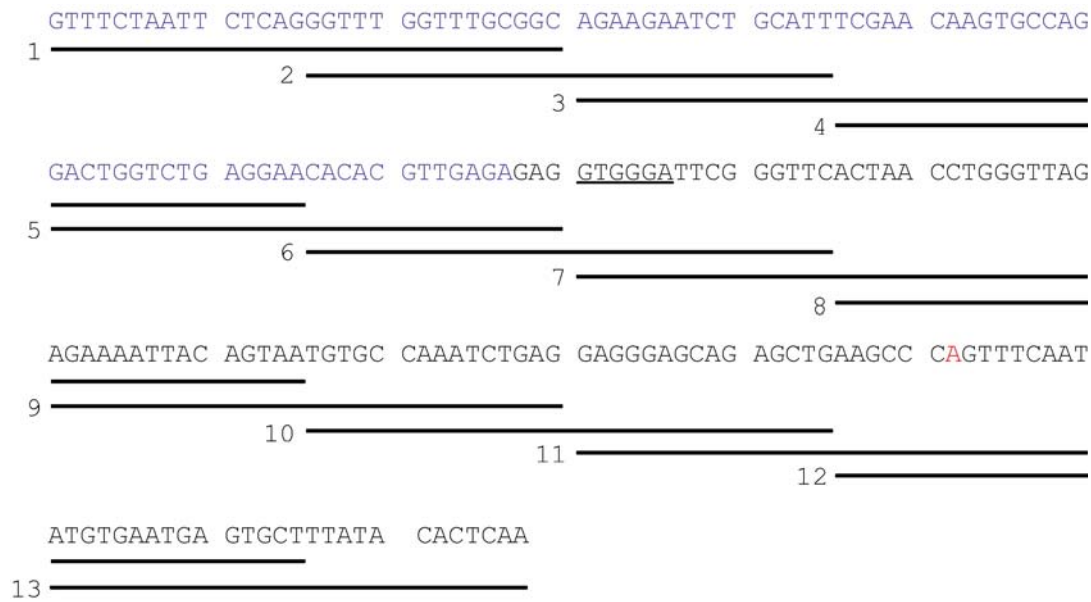
|        |   |
|--------|---|
| ON-6   | CACACGTTGAGAGAGGTGGGATTCGGGTTC          |
| ON-6.1 | CACACG <b>AAA</b> AGAGAGGTGGGATTCGGGTTC |
| ON-6.2 | CACACGTTG <b>TAC</b> GAGGTGGGATTCGGGTTC |
| ON-6.3 | CACACGTTGAGA <b>ATAG</b> TGGGATTCGGGTTC |
| ON-6.4 | CACACGTTGAGAGAG <b>TAC</b> GGATTCGGGTTC |
| ON-6.5 | CACACGTTGAGAGAGGTG <b>TTTT</b> TCGGGTTC |
| ON-6.6 | CACACGTTGAGAGAGGTGGGA <b>AAC</b> GGGTTC |

B



**Abb. 3.11:** (A) Übersicht über das mutierte Oligonukleotid ON-6. Die mutierten Nukleotide sind fett markiert. (B) Autoradiogramm des Electrophoretic Mobility Shift Assays. Spuren 1-4: ON-6.1, Spuren 5-8: ON-6.2, Spuren 9-12: ON-6.3, Spuren 13-16: ON-6.4, Spuren 17-20: ON-6.5, Spuren 21-24: ON-6.6. In der jeweils ersten Spur ist das nur das Oligonukleotid aufgetragen, in der jeweils zweiten Spur das Oligonukleotid mit dem leeren Retikulozyten-Lysat, in der jeweils dritten Spur das Oligonukleotid mit TIEG1 und in der jeweils vierten Spur das Oligonukleotid mit TIEG1 und dem Anti-c-Myc Antikörper. Für ON-6.4 und ON-6.5 konnte keine Bindung von TIEG1 nachgewiesen werden.



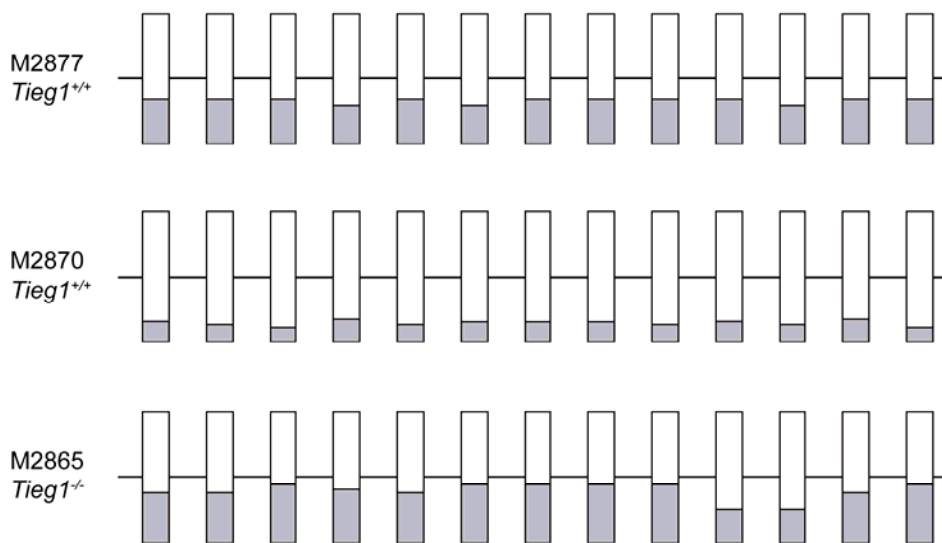


**Abb. 3.12:** Übersicht über die für EMSA verwendeten Oligonukleotide. Die Core-Bindestelle von TIEG1 im Oligonukleotid 6 ist unterstrichen, das MER5A Repeat ist hellblau markiert, der Polymorphismus P1 rot.

### 3.3.3 Methylierungsanalyse in Nachkommen von weiblichen *Tiegl*<sup>-/-</sup> Mäusen

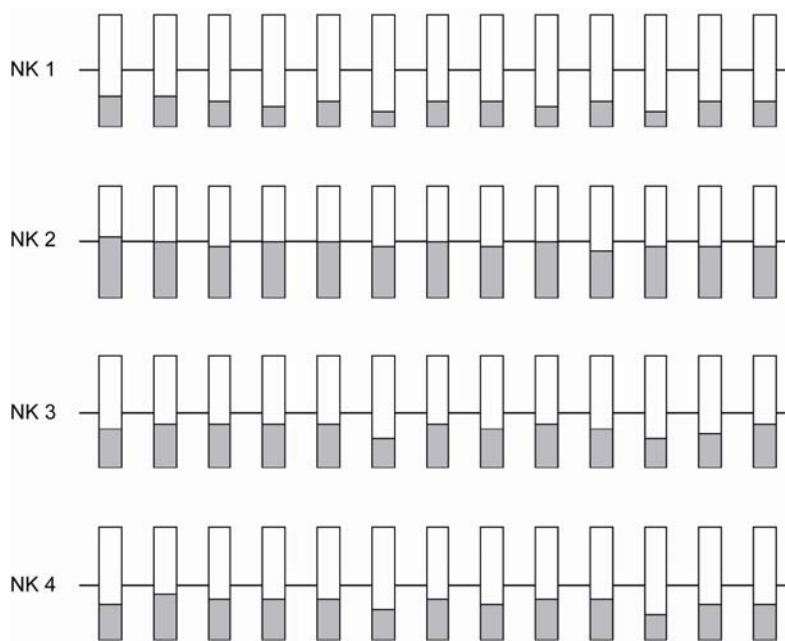
Falls TIEG1 eine Rolle beim maternalen Imprinting spielt, wäre es möglich, dass weibliche *Tiegl*<sup>-/-</sup> Mäuse nicht in der Lage sind, einen maternalen Imprint in ihrer Keimbahn zu etablieren und die Nachkommen von weiblichen *Tiegl*<sup>-/-</sup> und männlichen *Tiegl*<sup>+/+</sup> Mäusen könnten einen Imprinting Defekt auf ihrem maternalen Chromosom 7C, der orthologen Region zum humanen Chromosom 15, haben. Als Konsequenz sollte das maternale Allel einen paternalen Imprint aufweisen und die *Snurf-Snrpn* Promoter/Exon1 Region hypomethyliert sein. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde eine Methylierungsanalyse in solchen Tieren durchgeführt. Die DNA für die Methylierungsanalyse von *Tiegl*<sup>-/-</sup> Müttern, von ihren Nachkommen und von weiblichen Wildtyp Mäusen desselben Mausstamms wurde uns freundlicherweise von der Gruppe von Dr. Subramaniam zur Verfügung gestellt (Subramaniam *et al.*, 2005). Die *Tiegl*<sup>-/-</sup> Mäuse sind phänotypisch unauffällig. Auch die Brutcharakteristiken der *Tiegl*<sup>-/-</sup> Mäuse werden als normal beschrieben, was ebenso auf *Ube3a*<sup>-/-</sup> Mäuse zutrifft, die ein Mausmodell für das Angelman-Syndrom darstellen. Im Gegensatz zu *Ube3a*<sup>-/-</sup> Mäusen können in den *Tiegl*<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch keine Krampfanfälle induziert werden (persönliche Mitteilung Dr. Subramaniam). Die Methylierungsanalyse der *Snurf-Snrpn* Promoter/Exon1 Region wurde mittels Sequenzierung von klonierten PCR-Produkten, die an bisulfitbehandelter DNA amplifiziert wurden, durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine Bisulfitbehandlung an genomischer DNA durchgeführt. Durch die

Bisulfitbehandlung werden unmethylierte Cytosine in Uracil umgewandelt, die in der nachfolgenden PCR durch Thymin ersetzt werden. Methylierte Cytosine in CpGs sind gegen diese Umwandlung geschützt und verbleiben als Cytosine. Die Primer für die Amplifizierung der *Snurf-Snrpn* Promoter/Exon1 Region wurden so gewählt, dass sie keine CpGs überspannen und sowohl an das methylierte als auch an das unmethylierte Allel binden. Dadurch können beide Allele mit derselben Effizienz amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden in den pGEM-T Easy Vektor inseriert und 13 CpGs in jeweils ca. 20 Klonen per Individuum durch Sequenzierung untersucht. Als Kontrolle wurden zwei weibliche Wildtyp Mäuse und eine weibliche *Tiegl*<sup>-/-</sup> Maus analysiert. Diese Mäuse sollten ein normales Methylierungsmuster aufweisen. Das Methylierungsmuster für die Wildtyp Maus M2877 und für die *Tiegl*<sup>-/-</sup> Maus M2865 stimmt mit dem erwarteten Methylierungsmuster überein (Abb. 3.13). Für die Wildtyp Maus M2870 jedoch, wurde in zwei unabhängigen Experimenten eine eindeutige Verschiebung in Richtung Hypomethylierung gefunden (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13:** Methylierungsanalyse von 13 CpGs in der *Snurf-Snrpn* Promoter/Exon1 Region von weiblichen *Tiegl*<sup>+/+</sup> und *Tiegl*<sup>-/-</sup> Mäusen. Graue Boxen zeigen den Grad der Methylierung der einzelnen CpGs.

Falls TIEG1 eine Rolle beim maternalen Imprinting spielt, sollten die Nachkommen von weiblichen *Tiegl*<sup>-/-</sup> und männlichen *Tiegl*<sup>+/+</sup> Mäusen einen Imprinting Defekt haben und hypomethyliert für die *Snurf-Snrpn* Promoter/Exon1 Region sein. Es wurden insgesamt vier Nachkommen untersucht. In drei Nachkommen (NK2, NK3 und NK4) wurde ein normales Methylierungsmuster gefunden (Abb. 3.14). Nur ein Nachkomme (NK1) wies einen Trend in Richtung Hypomethylierung auf. Da aber eine der Kontrollen ebenfalls hypomethyliert ist, scheint dies eine normale Variation zu sein.



**Abb. 3.14:** Methylierungsanalyse von 13 CpGs in der *Snurf-Snrpn* Promoter/Exon1 Region von Nachkommen weiblicher *Tiegl*<sup>-/-</sup> Mäuse und männlicher *Tiegl*<sup>+/+</sup> Mäuse. Graue Boxen zeigen den Grad der Methylierung der einzelnen CpGs.

### 3.3.4 Identifizierung potentieller TIEG1 Bindepartner

*TIEG1* wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. Northern Blot Analysen zeigen hohe *TIEG1* mRNA Level in peripheren Blut Leukozyten, in der Milz und im Dickdarm und niedrigere Level im Thymus, im Dünndarm, in den Ovarien und in der Prostata (Fautsch *et al.*, 1998). Zudem wurde eine hohe Expression von *TIEG1* in verschiedenen Muskeltypen, mit der höchsten Expression im Skelettmuskel, nachgewiesen (Subramaniam *et al.*, 1995; Fautsch *et al.*, 1998). Falls *TIEG1* eine Rolle beim maternalen Imprinting spielt ist daher zu vermuten, dass *TIEG1* mit einem Oozyten-spezifischen Faktor interagiert. Zur Identifizierung eines solchen Faktors habe ich das GAL4 Yeast-Two-Hybrid System verwendet. Der offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*) von *TIEG1* wurde aus einer menschlichen Testis cDNA-Bank amplifiziert und in das GAL4 Köderplasmid (pGBKT7) inseriert. Durch die Insertion wurde die cDNA von *TIEG1* am N-Terminus mit der für die DNA-Bindedomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors kodierenden Region fusioniert. Die Expression der Fusionskonstrukte wurde durch Western-Blot Analyse unter Verwendung eines Anti-c-Myc Antikörpers überprüft (ohne Abb.). Es wurden zehn Hefeklone auf die Expression des Köderkonstruktes untersucht. Der Klon mit der stärksten Expression des Köderkonstruktes wurde mit einer menschlichen Ovar cDNA Bank (Clontech) transfiziert und auf Agar Platten mit Minimal-Medium ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin ausplattiert. Nach einer

Inkubationszeit von drei Tagen wurden insgesamt 83 Einzelkolonien identifiziert. Die Kolonien wurden einzeln kultiviert, die Plasmid-DNA isoliert und damit DH5 $\alpha$  Bakterien transformiert. Die Plasmid DNAs wurden wieder isoliert und mit dem GAL4 AD Primer ansequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels BlastN-Homologiesuche charakterisiert. Die identifizierten Proteine sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

**Tabelle 3.7:** Potentielle TIEG1 Bindepartner

| Anzahl Klone | potentielle Bindeproteine  |
|--------------|--|
| 20           | four and a half LIM domain 2 (FHL2)                              |
| 10           | fibulin 4 (FBLN4)  |
| 6            | fibulin 5 (FBLN5)  |
| 2            | fibulin 2 (FBLN2)  |
| 2            | fibulin 1 (FBLN1)  |
| 1            | fibulin 6 (FBLN6)  |
| 5            | seven in absentia homolog 1 (SIAH1)                              |
| 2            | seven in absentia homolog 2 (SIAH2)                              |
| 13           | zyxin (ZYG)  |
| 2            | pyruvate kinase, muscle (PKM2)                                   |
| 2            | metallothionein 2A (MT2A)  |
| 1            | CBF1 interacting corepressor (CIR)                               |
| 1            | ribosomal protein L13a (RPL13A)                                  |
| 1            | spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SAT)                   |
| 1            | eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1)      |
| 1            | ribosomal protein L7 (RPL7)                                      |
| 1            | integrin, beta1 (ITGB1)  |
| 1            | josephin domain containing 1 (JOSD1)                             |
| 1            | ubiquitously-expressed transcript (UXT)                          |
| 1            | splicing factor, arginine/serine-rich, 4 (SFRS4)                 |
| 1            | Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2 (WHSC2)                     |
| 1            | PREDICTED: Homo sapiens Wilms tumor 1 interacting protein (WTIP) |
| 1            | sterile alpha motif domain containing 4B (SAMD4B)                |
| 1            | ubiquitin-activating enzyme E1 (UBE1)                            |
| 1            | Homo sapiens RAD23 homolog A (S. cerevisiae) (RAD23)             |
| 1            | lamina-associated polypeptide 2                                  |
| 1            | chromosome 14 open reading frame 4 (c14orf4)                     |
| 1            | chromosome 3 clone RP11-905F6                                    |
| 1            | chromosome 1 open reading frame (c1orf126)                       |

Es wurden insgesamt 20 Klone, die für FHL2 (four and a half LIM domains 2) kodieren gefunden. Die Protein Sequenz von FHL2 enthält vier komplette LIM Domänen und die zweite Hälfte einer fünften LIM Domäne (Johannessen *et al.*, 2006). Bei der LIM-Domäne handelt es sich um eine Doppel-Zinkfinger-Struktur, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. LIM-Domänen-Proteine interagieren über ihre LIM-Domänen mit einer Vielzahl von Proteinen und Faktoren in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten. FHL2 wurde schon in mehreren Yeast-Two-Hybrid Screens als potentieller Bindepartner identifiziert

(persönliche Mitteilung Frank Kaiser). FHL2 ist an vielen zellulären Prozessen, wie z. B. der Regulierung der Genexpression, der Apoptose, der Regulierung des Zell-Zyklus, der Zelladhäsion oder der Signaltransduktion beteiligt (Johannessen *et al.*, 2006).

13 Klone kodieren für Zyxin. Zyxin ist ein Phosphoprotein, das drei LIM Domänen enthält und ubiquitär exprimiert wird (Macalma *et al.*, 1996).

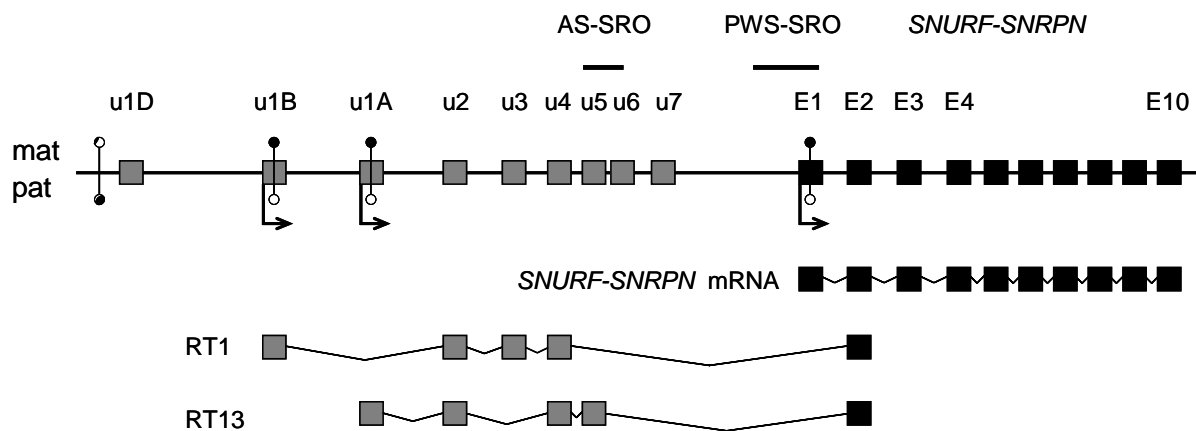
Es wurden 5 Klone, die für SIAH1 (seven in absentia homolog 1) und 2 Klone, die für SIAH2 kodieren gefunden. SIAH1 und SIAH2 sind E3 Ubiquitin Ligasen. Eine Bindung von TIEG1 und SIAH1 bzw. SIAH2 haben auch schon Johnsen *et al.* (2002a) in einem Yeast-Two-Hybrid Screen nachgewiesen. Weitere Analysen zur Interaktion zwischen TIEG1 und SIAH1 ergaben, dass eine Co-Expression von SIAH1 zu einem proteasomalen Abbau von TIEG1 führt (Johnsen *et al.*, 2002a). Bei meinem Yeast-Two-Hybrid Screen konnte ich für SIAH1 drei Klone identifizieren, die unterschiedliche Bereiche des Gens repräsentieren und auch im Fall von SIAH2 sind beide Klone unterschiedlich.

Erste Analysen der identifizierten Proteine aus dem Yeast-Two-Hybrid Screen brachten keinen Hinweis darauf, dass es sich bei einem dieser Proteine um einen Oozyten-spezifischen Faktor handelt. Daher soll an dieser Stelle auf eine weitere Beschreibung aller potentiellen TIEG1 Bindepartner verzichtet werden.

### 3.4 Methylierungsanalyse der u1B- und u1D-Region

Die elternspezifische Prägung der PWS/AS-Region wird durch ein Imprinting Center reguliert, das den Promoter/Exon 1 Bereich des *SNURF-SNRPN* Gens überlappt. Es konnten Transkripte identifiziert werden, die 5' von *SNURF-SNRPN* alternative Exons enthalten und auf Exon 2 von *SNURF-SNRPN* gespleißt werden (Dittrich *et al.*, 1996; Färber *et al.*, 1999). Diese Transkripte kommen in unterschiedlichen Spleißvarianten vor, überspannen das IC und werden daher als IC/*SNRPN*-Transkripte bezeichnet. Sie werden von zwei alternativen Startexons transkribiert, u1A und u1B (Abb. 3.15) und spielen möglicherweise eine Rolle bei der Imprint-Umschaltung in der Keimbahn (Dittrich *et al.*, 1996). Die IC/*SNRPN*-Transkripte werden ausschließlich vom paternalen, unmethyliertem Allel exprimiert. U1A und u1B weisen eine 84%ige Sequenzähnlichkeit zueinander auf. Es konnte zusätzlich eine weitere Region identifiziert werden, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zu u1A und u1B, sowie deren flankierenden Bereichen (PWCFOA, -B) aufweist. Diese Sequenz, u1D bzw. PWCFOA, liegt

etwa 63 kb proximal von u1B und besitzt eine konservierte Spleißstelle. Es konnte bisher jedoch keine Expression von u1D nachgewiesen werden (Färber *et al.*, 1999).



**Abb. 3.15:** Genomische Organisation der IC/*SNRPN*-Transkriptionseinheit. Die Transkriptionsstartpunkte (u1A, u1B, *SNURF-SNRPN*-Exon 1) sind als Pfeile dargestellt. Elternspezifisch methylierte CpGs sind als Kreissymbole dargestellt (weiß: nicht methyliert; schwarz: methyliert). Die u-Exons sind grau dargestellt, die Exons 1 – 10 des *SNURF-SNRPN* Gens schwarz. Zwei alternative Transkripte (RT1 und RT13) sind beispielhaft dargestellt.

Methylierungsanalysen von Färber *et al.* (1999) zeigten, dass die u1A- und u1B-Region auf dem maternalen Chromosom methyliert und auf dem paternalen Chromosom unmethyliert vorliegt. Die Untersuchung des Methylierungsstatus erfolgte mittels methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen und Southern-Blot Analyse. Die u1B-Region enthält drei, die u1A-Region zwei *CfoI*-Restriktionsschnittstellen, die ca. 40 – 60 bp stromaufwärts der Exons u1A bzw. u1B liegen. In der u1D-Region gibt es keine *CfoI*-Restriktionsschnittstellen. Jedoch gibt es ca. 3,3 kb proximal von u1D eine *CfoI*-Restriktionsschnittstelle, bei der ein genau entgegengesetztes Methylierungsmuster beobachtet wurde. Diese Stelle ist auf dem paternalen Chromosom hauptsächlich methyliert und auf dem maternalen Chromosom hauptsächlich unmethyliert (Färber *et al.*, 1999).

Um einen umfassenderen Einblick in das Methylierungsmuster der u1A-Region zu bekommen, haben Zeschnigk *et al.* (1997a) eine Methylierungsanalyse durch Sequenzierung bisulfitbehandelter DNA durchgeführt und außer den zwei *CfoI*-Restriktionsschnittstellen noch fünf weitere CpG-Dinukleotide analysiert. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Methylierung des maternalen Chromosoms zwischen 45% und 70% liegt und die Methylierung des paternalen Chromosoms zwischen 5% und 14%.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Methylierungsstatus von u1B im Detail analysiert und quantifiziert werden und der Methylierungsstatus von u1D bestimmt werden. Zusätzlich sollte

die Methylierung der *CfoI*-Restriktionsschnittstelle, die ca. 3,3 kb proximal von u1D liegt (im Folgenden als u1D-*CfoI*-Restriktionsschnittstelle bezeichnet) und der CpGs in ihrer Umgebung analysiert bzw. quantifiziert werden.

### 3.4.1 Methylierungsanalyse der u1B-Region

In der u1B-Region wurden insgesamt neun CpGs untersucht, die auch die drei *CfoI*-Restriktionsschnittstellen einschließen (Abb. 3.16). Dazu wurde eine PCR an bisulfitbehandelter DNA von zwei Normalpersonen und je einem Patienten mit PWS und einer Deletion und einem Patienten mit AS und einer Deletion durchgeführt. Die PCR-Fragmente wurden in den pGEM-T Easy Vektor kloniert und anschließend 21 bis 24 Klone je Individuum sequenziert. Es ist anzumerken, dass die Primer für die revers-komplementäre Sequenz generiert worden sind.

```

1      CAGCAACAGC CAGAGGTGGC AGAGAGCTGT CAGTCATCCC TGGGTGCCTC CTGCGCAAGC
                                     1      2
61     GCAGTTGTCC TCCTGCGCCG ACCTCGAATG CGGTCCTCCT GCTGCAGACC ACGCCCACCA
                                     3 4      5      6      7
121    AGGGCTGGCC GCAGCCACTG TAGCTGAGCT CAGAGCCTTC TGTGTGGTTT GCGGGGGCAA
                                     8
181    GGTCAGCTGC CCCCTGCCCT CTCTCTGGG

```

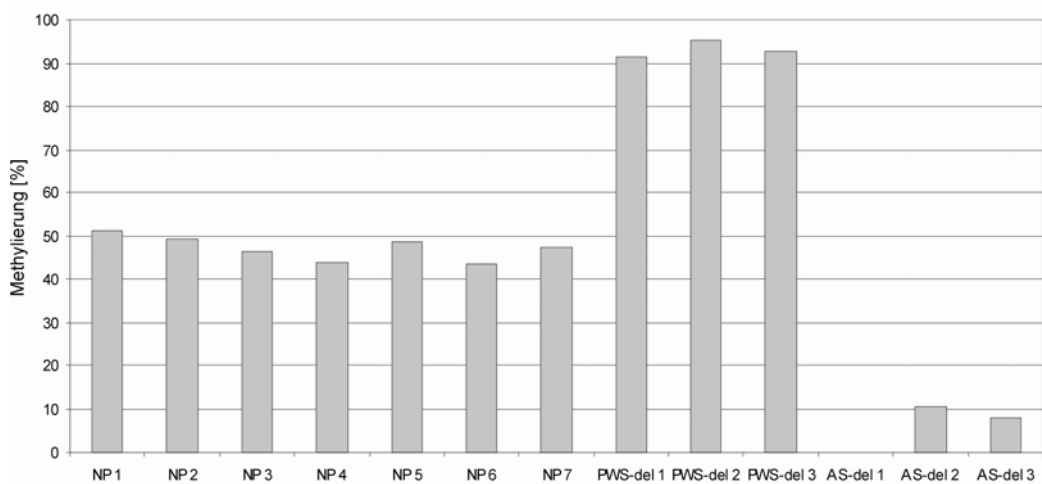
**Abb. 3.16:** Sequenzausschnitt der u1B-Region, der für die Methylierungsanalyse amplifiziert wurde. Die u1B Exonsequenz ist fett gedruckt und erstreckt sich über das 3'-Ende hinaus. Die neun analysierten CpGs sind unterstrichen und nummeriert. Die CpGs 1 – 3 representieren die *CfoI*-Restriktionsschnittstellen.

Bei den beiden Normalpersonen ist etwas mehr als die Hälfte der Klone komplett unmethyliert, die anderen Klone sind fast vollständig methyliert (Abb. 3.17). Die Tatsache, dass es überwiegend komplett methylierte bzw. unmethylierte Klone gibt, deutet darauf hin, dass eine elternspezifische Methylierung vorliegt. Um dies zu bestätigen wurden Patienten mit PWS bzw. AS und einer großen *de novo* Deletion des Bereichs 15q11-q13 analysiert. Diese Patienten besitzen nur die maternale bzw. paternale Kopie dieses Bereichs. Bei dem Patienten mit PWS sind die CpGs fast komplett methyliert, es gibt jedoch auch einige Klone, bei denen ein bis drei CpGs unmethyliert sind (Abb. 3.17). Bei dem Patienten mit AS sind nahezu alle CpGs unmethyliert, es gibt nur vier Klone mit methylierten CpGs. Es liegt somit eine allelspezifische Methylierung vor, das maternale Allel ist hypermethyliert, das paternale





methyliertem zu unmethyliertem Allel bestimmt werden. Da aber die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die einzelnen Basen markiert sind, unterschiedlich stark sind, erhält man auch bei einem Methylierungsverhältnis von 50:50 einen Wert ungleich eins. Um absolute quantitative Werte des Methylierungsgrades zu ermitteln, wurde eine Eichkurve erstellt, indem DNA von komplett methylierten und komplett unmethylierten Klonen in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt wurde. Mit Hilfe des R Software Pakets (<http://www.r-project.org>) wurden die absoluten Werte der Methylierung von sieben Normalpersonen und jeweils drei Patienten mit PWS bzw. AS und einer *de novo* Deletion des Bereichs 15q11-q13 (Abb. 3.18) berechnet.



**Abb. 3.18:** Diagramm der Methylierung des CpG 1 in sieben Normalpersonen (NP 1 – NP 7) und jeweils drei Patienten mit PWS bzw. AS und einer *de novo* Deletion.

Bei den sieben Normalpersonen lag der Grad der Methylierung zwischen 44% und 51%. Bei den Patienten mit PWS wird maximal ein Wert von 95% Methylierung erreicht, bei den Patienten mit AS liegen die Werte zwischen 0% und 10%.

### 3.4.2 Untersuchung des Methylierungsstatus der u1D-Region

Die u1D-Region enthält weniger CpGs als die u1A- und u1B-Region. Es wurden insgesamt vier CpGs in dieser Region analysiert (Abb. 3.19). Dazu wurde bisulfitbehandelte DNA von einem Patienten mit AS und einer Deletion und von einem Patienten mit PWS und einer Deletion amplifiziert. Diese Patienten besitzen jeweils nur das paternale bzw. maternale Allel dieser Region. Die PCR-Fragmente wurden in den pGEM-T Easy Vektor kloniert und die Klone anschließend sequenziert (Abb. 3.20).

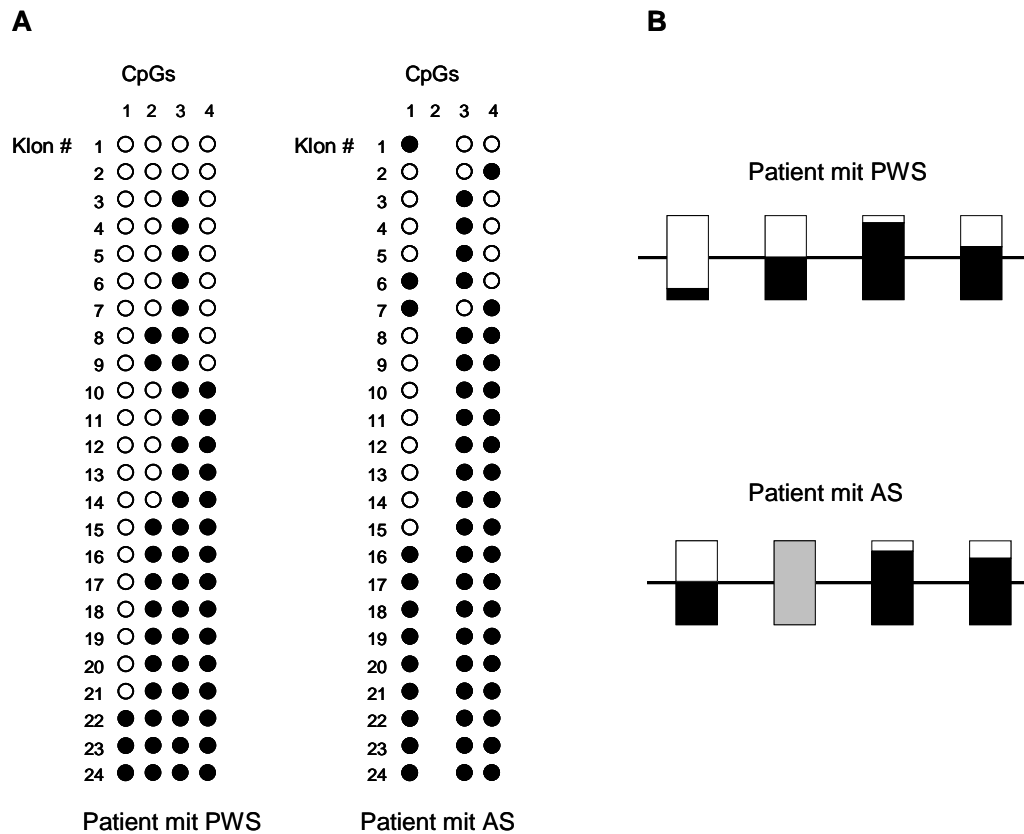
```

1  CTGTGTGCCT CCTGTGCAAG TGCAGTTGCC CTTGAAGGC AGTTCTCCTG CTGCAGACCA
    1           2
61  CGCCCACCAA GGGCGGAGTC ACAGCCACTG CAGGTGAGCT CAGAGCCTTC TGTGGGGTCT
    3           4
121 GCAGGGGCAA GGCCAGCTGT CCCCTGGGAT AGTTTGAAGA ATGCAGTTTG TTTGTATAAT
181 AAAGATGTTT CTCTACGTCA TTCATCTTGC TAATCAAGGA CGTTTAACAG CTTCAGACTT
241 TCCTGG

```

**Abb. 3.19:** Sequenzausschnitt der u1D-Region, der für die Methylierungsanalyse amplifiziert wurde. Die u1D Exonsequenz ist fett gedruckt. Die vier analysierten CpGs sind unterstrichen und nummeriert.

Bei einer allelspezifischen Methylierung würde man erwarten, dass man nur methylierte bzw. nur unmethylierte Klone findet, da die untersuchten Patienten mit PWS bzw. AS jeweils nur eine Kopie dieses Bereichs besitzen. Bei den Patienten fanden sich aber sowohl komplett methylierte als auch komplett unmethylierte Klone und Klone bei denen kein einheitliches Methylierungsmuster gefunden wurde. Bei dem Patienten mit PWS ist das CpG 1 stark hypomethyliert, das CpG 2 ist zu ca. 50% methyliert, das CpG 3 ist stark hypermethyliert und das CpG 4 weist eine leichte Hypermethylierung auf. Bei dem Patienten mit AS ist das CpG 1 zu ca. 50% methyliert und die CpGs 3 und 4 sind hypermethyliert. Der Patient mit AS enthielt im CpG 2 einen G zu A Austausch, weshalb bei diesem Patienten dieses CpG nicht analysiert werden konnte. Die Methylierung der vier untersuchten CpGs in der u1D Region ist somit nicht allelspezifisch.



**Abb. 3.20:** Methylierungsanalyse der u1D-Region. (A) Die Daten von jeweils 24 Klonen eines Patienten mit PWS und eines Patienten mit AS sind abgebildet. Schwarze Kreise, methylierte CpGs; weiße Kreise, unmethylierte CpGs (B) Schematische Übersicht. Die Boxen zeigen den Grad der Methylierung der einzelnen CpGs. Schwarze Box, methylierte CpGs; weiße Box, unmethylierte CpGs. Die graue Box bei dem Patienten mit AS steht für das nicht analysierte CpG.

### 3.4.3 Methylierungsanalyse der u1D-*Cfo*I-Restriktionsschnittstelle und ihrer Umgebung

Um die Methylierung der CpGs der u1D-*Cfo*I-Restriktionsschnittstelle und ihrer Umgebung zu analysieren, wurde eine PCR an bisulfitbehandelter DNA von einer Normalperson durchgeführt. An dem PCR-Fragment wurde dann eine *Nested*-PCR mit weiter innen liegenden Primern durchgeführt. Das 354 bp große PCR-Fragment, das sechs CpGs beinhaltet (Abb. 3.21), wurde in den pGEM-T Easy Vektor inseriert und die Klone anschließend sequenziert.

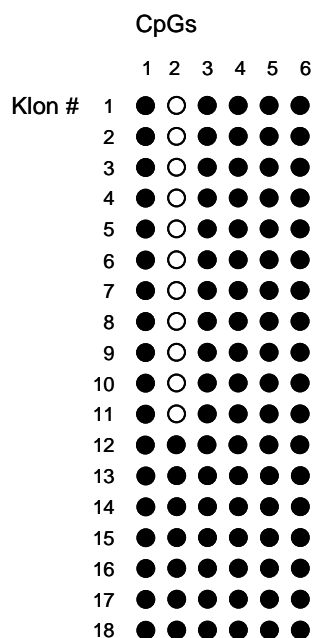
```

1      GGTTCATAG TATTAGTGAT GGCAGCAGTG GGCCATCGG AGCAGCTGCT GTTGTCATGC
1      1
61     TGGCCACTGT GGGGAGGGCA CAGGAGGAGG CAGAGCTGGG TCTGGGGTGG TGCTGCGCTC
1      2
121    CACAGAGCTG GCAGGAGCCA GGGACAAGTA GGAGTCCCCA GAGAAGCCCT GGGGGCCATC
181    ATGATTGGGA TGGACCAAGT TGCCCACTGG TCGGGGAGCA GCGCGGTCAG GCATGAAAGG
1      3      4 5
241    GTATGCAAAG AGGGTCCCAG TGAGAACCTG GGGCCCCTGC CCCAGGCTCT GAGGAGGCGC
1      6
301    AGCCAGGGCT TCCTGCATGC TCCACAGAAC AGGCAGGAGC CCTGCCCTCC CAGG

```

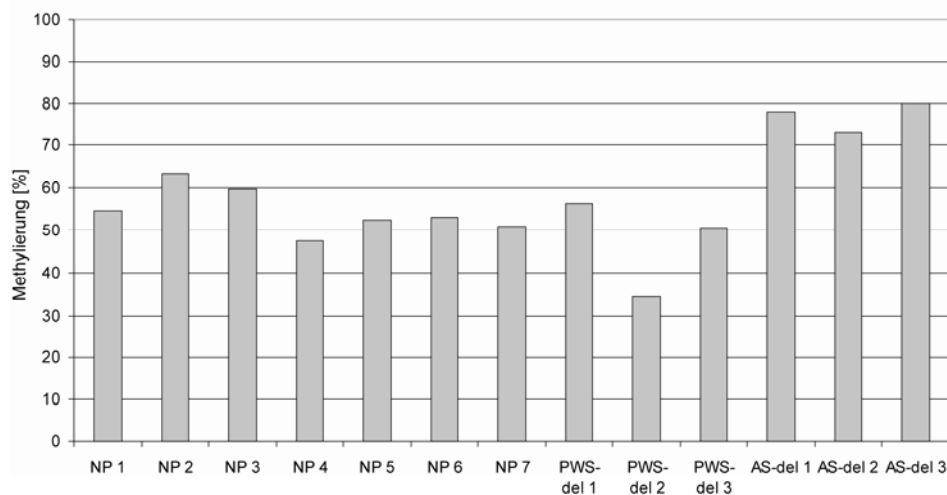
**Abb. 3.21:** Sequenzausschnitt der Umgebung der u1D-*Cfo*I-Restriktionsschnittstelle (CpG 2), der für die Methylierungsanalyse amplifiziert wurde. Die sechs analysierten CpGs sind unterstrichen und nummeriert.

Das CpG der *Cfo*I-Restriktionsschnittstelle (CpG 2) ist das einzige CpG in dem untersuchten Bereich, das eine differentielle Methylierung aufweist. Es ist in elf Klonen unmethyliert und in sieben Klonen methyliert. Die anderen fünf analysierten CpGs sind in allen Klonen komplett methyliert (Abb.3.22).



**Abb. 3.22:** Methylierungsanalyse der u1D-*Cfo*I-Restriktionsschnittstelle und ihrer Umgebung an einer Normalperson. Das CpG 2 repräsentiert die *Cfo*I-Restriktionsschnittstelle. Schwarze Kreise, methylierte CpGs, weiße Kreise, unmethylierte CpGs

Um die Methylierung des CpG 2, das differentiell methyliert ist, zu quantifizieren, wurde auch hier eine SNaPshot-Analyse etabliert. Dazu wurde wie bei der u1B-Region vorgegangen. Zunächst wurde die Sequenz, die die *CfoI*-Restriktionsschnittstelle umgibt, an bisulfitbehandelter DNA amplifiziert. Die SnaPshot-Analysen wurden mit einem Primer, der mit seinem 3'-Ende direkt vor dem Cytosin des CpGs der *CfoI*-Restriktionsschnittstelle liegt durchgeführt. Um absolute quantitative Werte zu ermitteln, wurde wieder eine Eichkurve aus komplett methylierten und komplett unmethylierten Klonen erstellt und die absoluten Werte der Methylierung von sieben Normalpersonen und jeweils drei Patienten mit PWS bzw. AS und einer *de novo* Deletion des Bereichs 15q11-q13 berechnet. Bei den Normalpersonen wurde eine Methylierung im Bereich von 48% - 63% gefunden. Zwei Patienten mit PWS weisen eine Methylierung von 51% bzw. 56% auf, ein Patient mit PWS ist jedoch leicht hypomethyliert und zeigt eine Methylierung von 34%. Die Patienten mit AS sind leicht hypermethyliert, die Methylierung liegt zwischen 73% und 80% (Abb. 3.23).



**Abb. 3.23:** Diagramm der Methylierung des CpG 2 in sieben Normalpersonen (NP 1 – NP 7) und jeweils drei Patienten mit PWS bzw. AS und einer *de novo* Deletion.

## 4. Diskussion

### 4.1 Identifizierung von *Cis*- und *Trans*-Faktoren, die das Risiko für einen Imprinting Defekt erhöhen

Imprinting Defekte (ID) sind Epimutationen, die durch Fehler beim Auslöschen des Imprints in den primordialen Keimzellen, bei der Etablierung des Imprints während der Gametogenese oder bei der Aufrechterhaltung des Imprints nach der Fertilisation entstehen. In der Mehrheit der Patienten mit Angelman-Syndrom (AS) oder Prader-Willi-Syndrom (PWS) und einem Imprinting Defekt werden die Fehler nicht durch Imprinting Center Mutationen verursacht, sondern repräsentieren wahrscheinlich stochastische Ereignisse. Im Rahmen meiner Studie an Patienten mit einem Imprinting Defekt konnte ich zeigen, dass die spontane Epimutationsrate möglicherweise durch *Cis*- und *Trans*-Faktoren erhöht werden kann.

#### 4.1.1 Der Haplotyp H-AS3 scheint mit einem erhöhten Risiko für einen Imprinting Defekt assoziiert zu sein

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass der Haplotyp H-AS3 des AS-SRO mit einem erhöhten Risiko für einen Imprinting Defekt auf dem maternalen Chromosom assoziiert zu sein scheint. Die Analyse der einzelnen Polymorphismen zeigt, dass ein erhöhtes Risiko auf das G Allele des Polymorphismus P1 und/oder das 4 bp Deletions Allel des Polymorphismus P3 zurückzuführen ist. Diese Allele sind nur im Haplotyp H-AS3 vorhanden. Auch in den nahe verwandten Primaten Schimpanse, Gorilla, Orang-Utan, Makake, Pavian und Wollaffe (Robert Nicholls und Kentaro Yamasaki, persönliche Mitteilung) sind diese Allele nicht zu finden. Es muss jedoch angemerkt werden, dass nur ein bis zwei Tiere pro Art analysiert worden sind. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese zwei Allele erst spät in der Evolution entstanden sind, wahrscheinlich innerhalb eines relativ engen Zeitfensters auf dem Haplotyp H-AS1.

Auch Murrell *et al.* (2004) konnten zeigen, dass bestimmte Sequenzvarianten in der Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) Region auf dem Chromosom 11 mit einer erhöhten Epimutationsrate assoziiert sind. Die Autoren identifizierten vier SNPs in der differentiell methylierten Region des *IGF2* Gens, die in drei von 16 möglichen Haplotypen auftraten. Bei Patienten mit BWS war im Vergleich zu einer Kontrollgruppe die Frequenz eines Haplotyps signifikant erhöht und die Frequenz eines anderen Haplotyps signifikant erniedrigt.

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass der AS-SRO mit dem PWS-SRO interagiert, um den mütterlichen Imprint in der weiblichen Keimbahn zu etablieren (Buiting *et al.*, 1995; Dittrich *et al.*, 1996; Shemer *et al.*, 2000; Perk *et al.*, 2002). Die molekularen Mechanismen sind unbekannt, aber es sind wahrscheinlich *Trans*-Faktoren involviert, die an den AS-SRO und den PWS-SRO binden. Es ist möglich, dass die Polymorphismen P1 und P3 innerhalb von Proteinbindestellen liegen, und dass das G Allel und/oder das 4 bp Deletions Allel einen *Trans*-Faktor weniger effizient bindet als das A Allel und/oder das 4 bp Insertions Allel. Dadurch könnte sich das Risiko erhöhen, dass der maternale Imprint nicht oder nicht vollständig etabliert wird. Falls der maternale Imprint nicht vollständig etabliert wird, könnte er während der genomweiten DNA Demethylierung in der frühen Embryogenese verloren gehen. In der Tat haben ca. 30% der Patienten mit AS und einem Imprinting Defekt ein somatisches Mosaik und bei einem Patienten konnte direkt nachgewiesen werden, dass der Imprinting Defekt sehr früh in der Entwicklung, noch vor der X-Inaktivierung und somit vor dem Blastozystenstadium, entstanden ist (Nazlican *et al.*, 2004).

Mittels EMSA mit entsprechenden Oligonukleotiden und unter Verwendung von ES Zellkernextrakten zeigten Kantor *et al.*, (2004a, 2004b), dass an den AS-SRO und an verschiedene Stellen des PWS-SRO Proteine binden. In transgenen Mäusen, die als Transgen ein Konstrukt mit dem humanen AS-SRO, PWS-SRO und 6 kb dazwischenliegender Sequenz enthielten, identifizierten sie im AS-SRO ein 18 bp Sequenz-Motiv (*allele discrimination signal*, ADS), das in Spermien methyliert und in Oozyten unmethyliert ist. Die differentielle Methylierung wurde in E7.5 alten Embryos aufrechterhalten. In erwachsenen Tieren jedoch ist das ADS auf beiden Allelen methyliert. Aufgrund der Methylierungsänderungen während der Entwicklung und den EMSA Experimenten vermuten die Autoren, dass das ADS eine Rolle im Imprinting Prozess spielt und Imprinting auf den PWS-SRO überträgt. Das ADS enthält den Polymorphismus P2, der in unserer Studie keinen signifikanten *P*-Wert zeigt. Jedoch ist die Relevanz der Proteinbindungsaktivität in ES Zellen unklar. ES Zellen sind nicht in der Lage einen Imprint zu setzen und es ist unwahrscheinlich, dass sie maternale Imprinting Faktoren enthalten.

Im Gegensatz zum AS-SRO ist der PWS-SRO wenig polymorph. Obwohl er fast fünfmal so groß ist wie der AS-SRO, der fünf Polymorphismen enthält, enthält er nur einen häufigen Polymorphismus 366 bp stromaufwärts von Exon 1. Es ist weder ein Allel noch ein Haplotyp in der PWS-SRO Region beobachtet worden, der mit einem erhöhten Risiko für einen Imprinting Defekt assoziiert ist. Im Gegensatz zum AS-SRO, der ein Kontroll-Element für die Etablierung des maternalen Imprints ist, ist der PWS-SRO kein Kontroll-Element für die

Etablierung des paternalen Imprints (El-Maarri *et al.*, 2001). Weiterhin wird bei Patienten mit PWS und einem primären Imprinting Defekt das Chromosom, das bei den Patienten den Imprinting Defekt trägt, immer von der väterlichen Großmutter vererbt (Buiting *et al.*, 2003). Das deutet darauf hin, dass der (groß)mütterliche Imprint nicht in der väterlichen Keimbahn ausgelöscht wurde. Möglicherweise ist die Auslöschung des Imprints ein passiver Prozess oder benötigt keine Faktoren, die an den PWS-SRO binden. Daher werden Fehler bei der Auslöschung des Imprints möglicherweise nicht durch DNA Sequenzvarianten beeinflusst. Obwohl diese Erklärung sinnvoll ist, gibt es alternative Erklärungen. 1. Der einzige häufige Polymorphismus (P8) innerhalb des PWS-SRO oder ein anderer seltener Polymorphismus, der im Kopplungsungleichgewicht mit dem Polymorphismus P8 ist, liegt außerhalb des kritischen Elements, das bei der Auslöschung des Imprints eine Rolle spielt und es gibt keine genetische Variation in diesem Element. 2. Die untersuchte Kohorte könnte zu klein sein um einen Effekt zu beobachten.

#### **4.1.2 Der *MTHFR* 677TT Genotyp scheint das Risiko für einen maternalen Imprinting Defekt zu erhöhen**

Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass Homozygotie für die 677C>T Variante des *MTHFR* Gens das Risiko für einen maternalen Imprinting Defekt möglicherweise erhöht. Die Häufigkeit des 677TT Genotyps war signifikant höher in Müttern von Patienten mit AS als in den Vätern der Patienten oder der allgemeinen Population ( $P = 0,028$ ). In der Regel sollten solche Befunde durch eine zweite unabhängige Studie bestätigt werden. Dies ist aber nicht möglich, da wir die meisten Familien, die weltweit zur Verfügung stehen, untersucht haben. Angenommen die Assoziation ist reell, würde das weit reichende Auswirkungen haben. Es würde nicht nur darauf hindeuten, dass Frauen, die homozygot für die 677C>T Variante sind, ein höheres Risiko haben, ein Kind mit einem Imprinting Defekt zu bekommen, sondern auch, dass die Ernährung Auswirkungen auf die Etablierung oder Aufrechterhaltung des Imprints haben könnte. Wolff *et al.* (1998) haben gezeigt, dass Folsäure-Spiegel die Methylierung von Transposons beeinflussen können. Ingrosso *et al.* (2003) haben nach einer Folsäure-Auswaschung bei Patienten mit Hyperhomocysteinämie eine biallelische Expression von *H19* beobachtet, das normalerweise nur vom maternalen Allel exprimiert wird. Nach einer Folsäurebehandlung beobachteten sie eine Verschiebung zurück zur monoallelischen Expression. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass die Autoren nicht direkt die



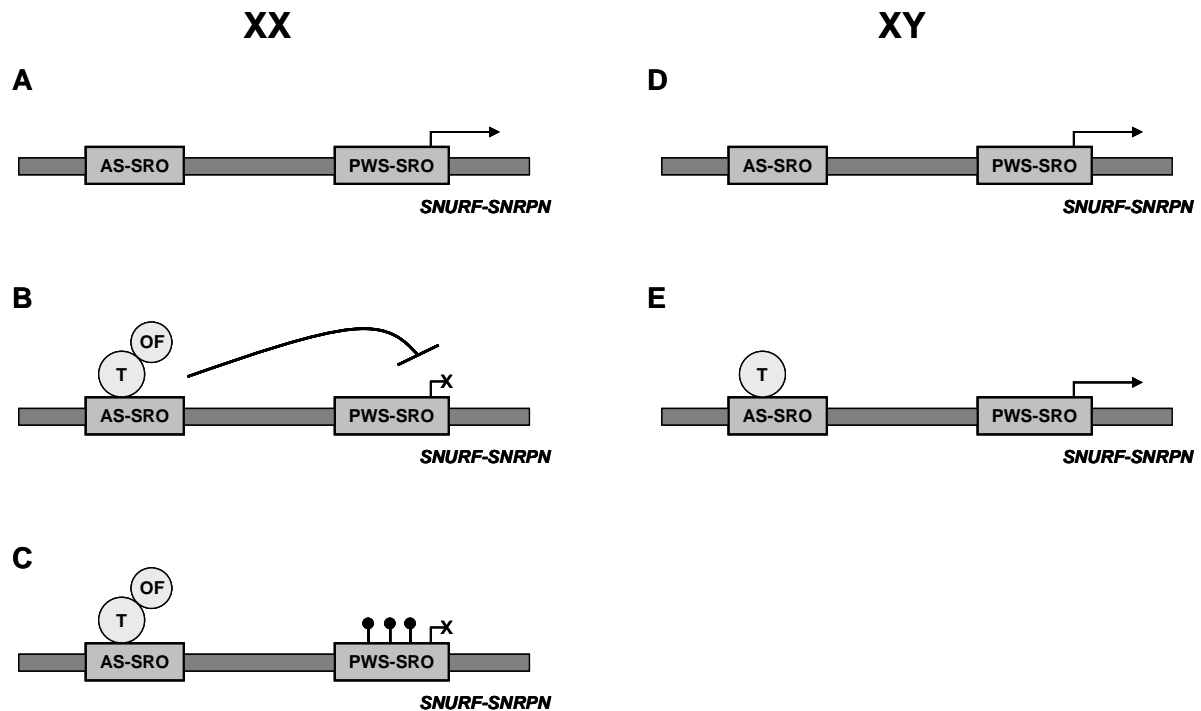
Methylierungsmuster analysiert haben und dass Änderungen der *H19* Expression auch ohne Veränderungen des Imprints auftreten können.

Ein Großteil der primären Epimutationen stellt wahrscheinlich stochastisch auftretende Fehler bei der Etablierung oder der Aufrechterhaltung des genetischen Zustands dar. Die spontane Epimutationsrate kann aber, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, durch genetische Varianz in *cis*-regulatorischen Elementen und *Trans*-Faktoren beeinflusst werden. Genetische Varianz in *Trans*-Faktoren wie MTHFR kann auch durch die Interaktion mit extrinsischen Faktoren den Epigenotyp modifizieren.

#### 4.2 Spielt TIEG1 eine Rolle beim maternalen Imprinting?

Der AS-SRO interagiert möglicherweise mit dem PWS-SRO um den mütterlichen Imprint in der weiblichen Keimbahn zu etablieren (Dittrich *et al.*, 1996; Shemer *et al.*, 2000; Perk *et al.*, 2002). An diesem Vorgang sind vermutlich *Trans*-Faktoren beteiligt, die an den AS-SRO und den PWS-SRO binden (Kantor *et al.*, 2004a; Kantor *et al.*, 2004b).

Mittels eines Yeast-One-Hybrid Screens hat Barbara Gärtner-Ruprecht (Kinderklinik Mainz) unter anderem TIEG1 (TGF $\beta$ -inducible early gene 1) als Bindefaktor des AS-SRO und somit als potentiellen Kandidaten für einen maternalen Imprinting Faktor identifiziert. TIEG1 gehört zur Familie der Sp1-ähnlichen/KLF (Specificity Protein 1/Krüppel-like Factor) Transkriptionsfaktoren und verschiedene Studien haben gezeigt, dass TIEG1 als Transkriptionsrepressor wirkt (Cook *et al.*, 1999, Tanabe *et al.*, 2002). *TIEG1* wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. Deshalb wäre eine wichtige Rolle von TIEG1 als maternaler Imprintingfaktor in Oozyten nur durch eine Interaktion mit einem Oozyten-spezifischen Faktor zu erklären. Wir schlagen folgendes Modell vor (Abb. 4.1): In der weiblichen Keimbahn bindet ein Oozyten-spezifischer Protein-Komplex, der TIEG1 beinhaltet, an den AS-SRO. Der entstandene Komplex interagiert mit dem PWS-SRO. Als Konsequenz kommt es zur Abschaltung der Expression von *SNURF-SNRPN* und zu einer *de novo* Methylierung des PWS-SRO und dann zur Inaktivierung aller weiteren geprägten Gene auf dem maternalen Chromosom. In der männlichen Keimbahn wird *TIEG1* entweder nicht exprimiert, oder *TIEG1* wird exprimiert und das Protein bindet an den AS-SRO, kann aber ohne einen Oozyten-spezifischen Faktor nicht als Silencer wirken und somit nicht *SNURF-SNRPN* reprimieren.



**Abb. 4.1:** Modell für die Etablierung des maternalen Imprints. In den Keimzellen wird *SNURF-SNRPN* standardmäßig exprimiert (**A** und **D**). In der weiblichen Keimbahn bindet ein Oozyten-spezifischer Proteinkomplex, der *TIEG1* beinhaltet, an den AS-SRO und wirkt als Silencer von *SNURF-SNRPN* (**B**). Dadurch kommt es zu einer Methylierung des PWS-SRO (**C**). In der männlichen Keimbahn wird *TIEG1* entweder nicht exprimiert (**D**), oder *TIEG1* wird exprimiert und das Protein bindet an den AS-SRO, kann aber ohne einen Oozyten-spezifischen Faktor nicht als Repressor wirken (**E**). Die Folge in beiden Fällen ist, dass *SNURF-SNRPN* exprimiert wird. XX, weibliche Keimbahn; XY, männliche Keimbahn; T, *TIEG1*; OF, Oozyten-spezifischer Faktor; schwarz ausgefüllte Kreissymbole, Methylierung.

Mittels EMSA Experimenten konnte ich die Bindung von *TIEG1* an den AS-SRO bestätigen und eingrenzen. Es waren jedoch auch viele unspezifische Banden auf dem Autoradiogramm zu erkennen, was darauf hindeutet, dass noch weitere Proteine an das AS-SRO Fragment binden. Die Bindestelle von *TIEG1* konnte auf einen GT-reichen Bereich eingegrenzt werden. Bisher ist gezeigt worden, dass *TIEG1* an die klassische GC-Box bindet (Cook *et al.*, 1999, Tanabe *et al.*, 2002). Es ist aber bekannt, dass Mitglieder der Familie der KLF Transkriptionsfaktoren, zu der *TIEG1* zählt, auch häufig an GT-Boxen binden, was mit meinen Befunden übereinstimmt. Die Bindestelle von *TIEG1* überlappt nicht mit einem Polymorphismus, der das Risiko für einen Imprinting Defekt auf dem maternalen Chromosom modifiziert. Es ist aber gut möglich, dass es noch weitere Faktoren gibt, die an den AS-SRO binden und auch eine Rolle beim maternalen Imprinting spielen. Beim Yeast-One-Hybrid Screen wurden noch weitere potentielle Bindepartner des AS-SRO identifiziert. Es wäre zu überlegen, einige dieser Proteine weiter zu untersuchen und die Bindestelle einzugrenzen.

Um die mögliche Rolle von TIEG1 als Repressor der IC Gentranskription zu analysieren, habe ich Luciferase Reporter Assays durchgeführt. Diese zeigten, dass TIEG1 eine reprimierende Wirkung auf den SV40 Promoter ausübt. Der Grund dafür sind wahrscheinlich mehrere Sp1-Bindestellen innerhalb des SV40 Promoters. Cook *et al.* (1999) haben gezeigt, dass TIEG1 an GC-reiche Sp1-ähnliche *cis*-regulatorische Sequenzen bindet und Promotoren, die GC-reiche Sequenzen enthalten, reprimiert. Mit Reporter-Konstrukten, die Promotoren ohne Sp1-Bindestellen enthalten, konnte jedoch keine reprimierende Wirkung von TIEG1 auf den AS-SRO nachgewiesen werden. Dies bedeutet aber nicht, dass TIEG1 tatsächlich keinen Effekt auf den AS-SRO hat. Möglicherweise interagiert TIEG1 mit weiteren Faktoren, die an den AS-SRO binden, um als Repressor zu fungieren. Diese Faktoren sind vielleicht Oozyten-spezifisch und in den CHO-Zellen, die für die Experimente genutzt worden sind, nicht vorhanden.

Falls TIEG1 eine Rolle beim maternalen Imprinting spielt, sollten weibliche *Tiegl*<sup>-/-</sup> Mäuse nicht in der Lage sein, einen maternalen Imprint in ihrer Keimbahn zu etablieren und die Nachkommen von weiblichen *Tiegl*<sup>-/-</sup> Mäusen sollten einen Imprinting Defekt auf ihrem maternalen Chromosom 7C, der orthologen Region zum humanen Chromosom 15, haben. Als Konsequenz sollte das maternale Allel einen paternalen Imprint aufweisen und die *Snurf-Snrpn* Promoter/Exon1 Region hypomethyliert sein. Unsere Untersuchungen zeigten, dass das Methylierungsmuster der Nachkommen von weiblichen *Tiegl*<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch nicht auffällig ist. Es gibt drei mögliche Erklärungen für dieses Ergebnis. 1. TIEG1 spielt keine Rolle beim Imprinting und die Tatsache, dass TIEG1 an den menschlichen AS-SRO bindet, hat keine biologische Relevanz. 2. TIEG1 spielt eine Rolle beim Imprinting, aber in Abwesenheit von TIEG1 übernimmt ein anderer Faktor, wie z. B. TIEG2 oder TIEG3 diese Aufgabe. In der Tat haben TIEG2 und TIEG3 nahezu die gleichen Merkmale und Funktionen wie TIEG1. Sie enthalten am C-Terminus drei Zink-Finger DNA-Bindedomänen und am N-Terminus drei Repressions-Domänen (Cook *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004). Sie binden an CG-reiche/Sp1-ähnliche DNA-Sequenzen und wirken als Transkriptionsrepressor. Es konnte gezeigt werden, dass zumindest in einigen Fällen TIEG1 und TIEG2 die gleichen Gene regulieren (Johnsen *et al.*, 2002a). 3. Die Kontrolle des maternalen Imprintings ist zwischen der Maus und dem Menschen nicht konserviert. In der Tat ist die Sequenz des menschlichen AS-SRO in Mäusen bisher nicht identifiziert worden. Es ist möglich, dass in der Maus die IC/*Snurf* Transkripte die Rolle des AS-SRO übernehmen und als *cis*-agierendes Element fungieren (Mapendano *et al.*, 2006). Die murinen IC/*Snurf* Transkripte werden im Gehirn (speziell in den Neuronen) und im Ovar (speziell in den Oozyten und den Granulosa Zellen) stark exprimiert, während in

anderen Geweben keine Expression nachgewiesen wurde (Mapendano *et al.*, 2006). Es gibt jedoch auch Studien, die zeigen, dass es in Mäusen vermutlich ein funktionelles Äquivalent zum menschlichen AS-SRO gibt. Es gibt zwei Mausmodelle, bei denen Imprinting Defekte nachgewiesen wurden. Eine Insertions/Duplikations Mutation 13 kb stromaufwärts des *Snurf-Snrpn* Exon 1 führte nach Transmission durch die weibliche Keimbahn zu einem Verlust der Methylierung des maternalen *Snurf-Snrpn* Promoters, zu einer Aktivierung von *Snurf-Snrpn* und einer reduzierten Expression von *Ube3a*. Auch eine Deletion, die sich über den Bereich 80 kb stromaufwärts der ersten Mutation erstreckt, verursachte einen ähnlichen Imprinting Defekt mit variabler Penetranz (Wu *et al.*, 2006).

Falls TIEG1 eine Rolle beim maternalen Imprinting spielt ist zu vermuten, dass TIEG1 mit einem Oozyten-spezifischen Faktor interagiert, da *TIEG1* in vielen verschiedenen Geweben exprimiert wird. Um einen solchen Faktor zu identifizieren, habe ich einen Yeast-Two-Hybrid Screen durchgeführt. Die Expressionsdaten über die gefundenen Proteine aus dem Yeast-Two-Hybrid Screen zeigten in elektronischen Northern-Blots (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas>) und in Publikationen für keinen der identifizierten Bindepartner eine Oozyten-spezifische Expression. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst auf eine Verifizierung der Yeast-Two-Hybrid Daten und auf eine weitere Analyse der potentiellen TIEG1 Bindepartner verzichtet. Es sind jedoch weiterführende Analysen notwendig, um herauszufinden, ob einer der identifizierten Bindepartner ein guter Kandidat für einen Oozyten-spezifischen Faktor darstellt. Ein Hinweis darauf, dass der Yeast-Two-Hybrid Screen gut funktioniert hat, ist die Tatsache, dass ich einen schon bekannten Interaktionspartner von TIEG1, nämlich SIAH1, gefunden habe (Johnsen *et al.*, 2002a). Für SIAH1 konnte ich fünf Klone identifizieren, von denen drei Klone für unterschiedliche Bereiche des Gens kodieren.

Die Experimente lieferten keine Hinweise, dass TIEG1 tatsächlich als maternaler Imprinting Faktor wirkt und das oben vorgeschlagene Modell richtig ist. Trotzdem ist eine Rolle von TIEG1 als maternaler Imprinting Faktor nicht ausgeschlossen. Die Expression von *TIEG1* wird durch TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) induziert (Subramaniam *et al.*, 1998). Ingman *et al.* (2006) zeigten, dass die Entwicklung der Nachkommen von weiblichen *TGF $\beta$ 1* Knock-Out Mäusen im Morula Stadium zum Stillstand kommt. Sie vermuten, dass die Oozyten dieser Mäuse in ihrer Entwicklung gestört sind und es dadurch zu einem Abbruch der Embryoentwicklung kommt. Auch Fried und Wramsby (1998) konnten zeigen, dass TGF $\beta$ 1 möglicherweise bei der Follikel- und Oozytenreifung eine Rolle spielt und wichtig ist für die erfolgreiche Embryoentwicklung.

### 4.3 Methylierungsanalyse der Upstream Exons von *SNURF-SNRPN*

Die IC/*SNRPN*-Transkripte überspannen die IC-Region und werden von zwei alternativen 5' Startexons transkribiert (u1A und u1B), die eine hohe Sequenzähnlichkeit zueinander und zu einer weiteren verwandten Sequenz (u1D) weiter proximal aufweisen (Dittrich *et al.*, 1996; Färber *et al.*, 1999). Die Transkripte werden, wie das *SNURF-SNRPN* Gen, elternspezifisch von dem paternalen Chromosom 15 exprimiert.

Die von mir durchgeführte Methylierungsanalyse von neun CpGs in der u1B-Region zeigte, dass eine allelspezifische Methylierung vorliegt. Das maternale Chromosom ist hypermethyliert, was durch die Analyse eines Patienten mit PWS und einer *de novo* Deletion des Bereichs 15q11-q13, der für diesen Bereich nur die maternale Kopie besitzt, gezeigt werden konnte. Bei einem Patienten mit AS, der nur die paternale Kopie besitzt, ist dasselbe DNA Segment fast komplett unmethyliert. Das Methylierungsmuster ähnelt somit eher dem der *SNURF-SNRPN* Promoter/Exon 1 Region als dem der u1A-Region. Die *SNURF-SNRPN* Promoter/Exon 1 Region ist auf dem maternalen Chromosom nahezu komplett methyliert und auf dem paternalen Chromosom nahezu komplett unmethyliert. Im Gegensatz dazu ist in der u1A-Region das maternale Chromosom zwischen 45 und 70% methyliert und das paternale Chromosom zwischen 5 und 14% (Zeschnigk *et al.*, 1997a). Somit ist auch die u1B-Region, genauso wie die bislang in der Routinediagnostik genutzte *SNURF-SNRPN* Promoter/Exon 1 Region (Zeschnigk *et al.*, 1997b) für Methylierungsanalysen in der PWS bzw. AS Diagnostik geeignet. Es ist jedoch zu beachten, dass die drei *CfoI*-Restriktionsschnittstellen in den einzelnen Klonen nicht immer ein durchgängiges Methylierungsmuster aufweisen. Bei Diagnostikmethoden, bei denen methylierungssensitive Restriktionsenzyme genutzt werden, wie z. B. der MS-MLPA (*methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*) (Procter *et al.*, 2006), kann dies zu verfälschten Ergebnissen führen. Bei einem solchen Test reicht es aus, wenn eine *CfoI*-Restriktionsschnittstelle unmethyliert ist, damit das Restriktionsenzym schneidet. Somit kann man zu der falschen Schlussfolgerung kommen, dass an diesem Locus eine Hypomethylierung vorliegt.

Bei der Analyse der Kontrollpersonen fiel auf, dass es mehr unmethylierte als methylierte Klone gibt. Bei Klonierungen von bisulfitbehandelter DNA ist schon häufiger beobachtet worden, dass es zu einer Verschiebung in Richtung unmethylierte bzw. methylierte Klone kommt. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es PCR- und Klonierungsvorteile für methylierte bzw. unmethylierte Klone gibt.

Für eine quantitative Untersuchung der u1B-Region habe ich eine SNaPshot Analyse etabliert. Diese zeigte, dass der Methylierungsgrad der Normalpersonen um die 50% bzw. leicht darunter liegt. Bei Patienten mit PWS und einer Deletion des Bereichs 15q11-q13 liegt der Grad der Methylierung zwischen 91% und 95%, bei Patienten mit AS und einer Deletion liegt der Methylierungsgrad zwischen 0% und 10%. Die SNaPshot Ergebnisse spiegeln sich auch in den Klonen wieder. Bei dem Patienten mit PWS, der in der SNaPshot-Analyse eine Methylierung von 92% aufweist ist das Cytosin des CpG 1, das bei der SNaPshot-Analyse untersucht worden ist, nicht immer komplett methyliert. Bei dem Patienten mit AS der in der SNaPshot-Analyse einen Methylierungsgrad von 0% zeigt, ist das Cytosin des CpG 1 bis auf einen Klon vollständig unmethyliert. Die Tatsache, dass man bei der SNaPshot-Analyse auch Werte bis 10% Methylierung erhält, lässt sich dadurch erklären, dass es zwischen verschiedenen Individuen auch kleine individuelle Unterschiede in der Methylierung gibt.

Bisher konnte keine Expression von u1D nachgewiesen werden (Färber *et al.*, 1999). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die u1D-Region nicht allelspezifisch methyliert. Es ist möglich, dass u1D durch eine Duplikation von u1A oder u1B entstanden ist und eine funktionelle Bedeutung verloren hat. Infolgedessen ist es möglich, dass auch eine differentielle Methylierung verloren gegangen ist.

Southern-Blot Analysen an jeweils zwei Patienten mit PWS bzw. AS und einer *de novo* Deletion im Bereich 15q11-q13 zeigten, dass die u1D-CfoI-Restriktionsschnittstelle im Gegensatz zu allen anderen differentiell methylierten Regionen in 15q11-q13 ein entgegengesetztes Methylierungsmuster aufweist. Sie ist auf dem maternalen Chromosom tendenziell unmethyliert und auf dem paternalen Chromosom tendenziell methyliert (Färber *et al.*, 1999). Die von mir durchgeführten SNaPshot-Analysen von jeweils drei Patienten mit PWS bzw. AS und einer Deletion zeigten nicht so ein klares Methylierungsmuster wie die Southern-Blot Analysen. Der Grad der Methylierung bei Normalpersonen schwankt zwischen 48% und 63%. Patienten mit AS sind zwar leicht hypermethyliert, jedoch erreicht die Methylierung nur Werte zwischen 73% und 80%. Patienten mit PWS zeigten eine interindividuelle Variabilität bezüglich des Methylierungsmusters. Während zwei Patienten ein normales Methylierungsmuster zeigten, war ein Patient hypomethyliert (34%). Ein Beweis dafür, dass die SNaPshot-Analyse funktioniert hat, ist, dass die Eichkurve, die mittels Klonen hergestellt wurde, gute Werte liefert. Der Grund für die interindividuelle Variabilität ist unklar.

## 5. Zusammenfassung

Bei einer kleinen Gruppe von Patienten mit Prader-Willi-Syndrom (PWS) und Angelman-Syndrom (AS) wird die Inaktivierung der geprägten Gene in der chromosomalen Region 15q11-q13 durch einen Imprinting Defekt (ID) verursacht. Die Patienten haben scheinbar normale Chromosomen 15 biparentaler Herkunft, jedoch weist das paternale Chromosom bei Patienten mit PWS eine maternale Prägung auf, wohingegen das maternale Chromosom bei Patienten mit AS eine paternale Prägung aufweist. In der Mehrzahl der Patienten mit einem ID ist der Imprintingfehler eine primäre Epimutation, die spontan in der Abwesenheit von DNA Sequenzveränderungen auftritt.

Die spontane Epimutationsrate kann aber möglicherweise durch *Cis*- und *Trans*-Faktoren erhöht werden. Ich konnte in meiner Arbeit zeigen, dass der Haplotyp H-AS3 des AS-SRO vermutlich mit einem erhöhten Risiko für einen Imprinting Defekt auf dem maternalen Chromosom assoziiert ist. Weiterhin konnte ich zwei Polymorphismen identifizieren, auf die das erhöhte Risiko zurückzuführen ist.

In einer Studie von Müttern mit Kindern mit AS und einem Imprinting Defekt konnte ich zeigen, dass eine Homozygotie für die 677C>T Variante des 5,10-Methylenetetrahydrofolat Reduktase (*MTHFR*) Gens das Risiko für einen maternalen Imprinting Defekt vermutlich erhöht.

Der AS-SRO interagiert möglicherweise mit dem PWS-SRO, um den mütterlichen Imprint in der weiblichen Keimbahn zu etablieren. An diesem Vorgang sind vermutlich *Trans*-Faktoren beteiligt, die an den AS-SRO und den PWS-SRO binden. Ich konnte mittels EMSA nachweisen, dass TIEG1 (TGFβ-inducible early gene 1) an den AS-SRO bindet und die Bindestelle eingrenzen. Bislang gibt es aber keine funktionellen Daten, die eine Beteiligung von TIEG1 beweisen.

Das Imprinting Center wird von alternativen Transkripten des *SNURF-SNRPN* Gens überspannt, die ausgehend von zwei alternativen Startexons (u1A und u1B) exprimiert werden. Diese beiden Exons zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit zueinander und zu einer weiteren Sequenz (u1D). In meiner Analyse von u1B und u1D stellte sich heraus, dass CpG-Dinukleotide in der u1B-Region elternspezifisch methyliert sind. Sie liegen auf dem maternalen Allel methyliert und auf dem paternalen Allel unmethyliert vor. Für die u1D-Region hingegen konnte keine elternspezifische Methylierung nachgewiesen werden.

## 6. Literatur

- Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanaach BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaudet AL (1997) Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, *Ube3a*, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet* **17**: 75-78.
- Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD (1999) Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* **65**: 370-386.
- Angelman H (1965) Puppet children: A report of three cases. *Dev Med Neurol* **7**: 681-688.
- Angulo M, Castro-Magana M, Uy J, Rosenfeld W (1992) Growth hormone evaluation and treatment in Prader-Willi syndrome. Nato ASI Series (Ed. by S. B. Cassidy) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, *Cell Biol* **61**: 171-174.
- Arima T, Drewell RA, Arney KL, Inoue J, Makita Y, Hata A, Oshimura M, Wake N, Surani MA (2001) A conserved imprinting control region at the *HYMAI/ZAC* domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet* **10**: 1475-1483.
- Bachellerie JP und Cavaille J (1997) Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends Biochem Sci* **22**: 257-261.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* **16**: 37-48.
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**: 120-124.
- Barlow DP, Stoger R, Herrmann BG, Saito K, Schweifer N (1991) The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* **349**: 84-87.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**: 263-265.
- Barton SC, Surani MA, Norris ML (1984) Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* **311**: 374-376.
- Bielinska B, Blaydes SM, Buiting K, Yang T, Krajewska-Walasek M, Horsthemke B, Brannan CI (2000) De novo deletions of *SNRPN* exon 1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. *Nat Genet* **25**: 74-78.
- Bischof JM, Stewart CL, Wevrick R (2007) Inactivation of the mouse *Magel2* gene results in growth abnormalities similar to Prader-Willi Syndrome. *Hum Mol Genet*.
- Boccaccio I, Glatt-Deeley H, Watrin F, Roeckel N, Lalande M, Muscatelli F (1999) The human *MAGEL2* gene and its mouse homologue are paternally expressed and mapped to the Prader-Willi region. *Hum Mol Genet* **8**: 2497-2505.
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294**: 2536-2539.
- Bower BD und Jeavons PM (1967) The "happy puppet" syndrome. *Arch Dis Child* **42**: 298-302.



- Buiting K, Greger V, Brownstein BH, Mohr RM, Voiculescu I, Winterpacht A, Zabel B, Horsthemke B (1992) A putative gene family in 15q11-13 and 16p11.2: possible implications for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5457-5461.
- Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B (1995) Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* **9**: 395-400.
- Buiting K, Dittrich B, Ende S, Horsthemke B (1997) Identification of novel exons 3' to the human *SNRPN* gene. *Genomics* **40**: 132-137.
- Buiting K, Gross S, Ji Y, Senger G, Nicholls RD, Horsthemke B (1998a) Expressed copies of the *MN7 (D15F37)* gene family map close to the common deletion breakpoints in the Prader-Willi/Angelman syndromes. *Cytogenet Cell Genet* **81**: 247-253.
- Buiting K, Dittrich B, Gross S, Lich C, Farber C, Buchholz T, Smith E, Reis A, Burger J, Nothen MM, Barth-Witte U, Janssen B, Abeliovich D, Lerer I, van den Ouweland AM, Halley DJ, Schrandt-Stumpel C, Smeets H, Meinecke P, Malcolm S, Gardner A, Lalonde M, Nicholls RD, Friend K *et al.* (1998b) Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: implications for imprint-switch models, genetic counseling, and prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* **63**: 170-180.
- Buiting K, Lich C, Cottrell S, Barnicoat A, Horsthemke B (1999) A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Hum Genet* **105**: 665-666.
- Buiting K, Farber C, Kroisel P, Wagner K, Brueton L, Robertson ME, Lich C, Horsthemke B (2000) Imprinting center deletions in two PWS families: implications for diagnostic testing and genetic counseling. *Clin Genet* **58**: 284-290.
- Buiting K, Gross S, Lich C, Gillissen-Kaesbach G, el-Maarri O, Horsthemke B (2003) Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet* **72**: 571-577.
- Buiting K, Nazlican H, Galetzka D, Wawrzik M, Gross S, Horsthemke B (2007) *C15orf2* and a novel noncoding transcript from the Prader-Willi/Angelman syndrome region show monoallelic expression in fetal brain. *Genomics* **89**: 588-595.
- Butler MG und Palmer CG (1983) Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome. *Lancet* **1**: 1285-1286.
- Butler MG, Bittel DC, Kibiryeva N, Talebizadeh Z, Thompson T (2004) Behavioral differences among subjects with Prader-Willi syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy. *Pediatrics* **113**: 565-573.
- Carlson LL, Page AW, Bestor TH (1992) Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. *Genes Dev* **6**: 2536-2541.
- Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, de Almeida IT (2004) 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T and 1298A→C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet* **41**: 454-458.
- Cattanach BM und Kirk M (1985) Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* **315**: 496-498.

- Cattanach BM, Barr JA, Evans EP, Burtenshaw M, Beechey CV, Leff SE, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Jones J (1992) A candidate mouse model for Prader-Willi syndrome which shows an absence of *Snrpn* expression. *Nat Genet* **2**: 270-274.
- Cattanach BM, Barr JA, Beechey CV, Martin J, Noebels J, Jones J (1997) A candidate model for Angelman syndrome in the mouse. *Mamm Genome* **8**: 472-478.
- Cavaille J, Buiting K, Kieffmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, Bachellerie JP, Brosius J, Huttenhofer A (2000) Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14311-14316.
- Chai JH, Locke DP, Greally JM, Knoll JH, Ohta T, Dunai J, Yavor A, Eichler EE, Nicholls RD (2003) Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons. *Am J Hum Genet* **73**: 898-925.
- Chamberlain SJ und Brannan CI (2001) The Prader-Willi syndrome imprinting center activates the paternally expressed murine *Ube3a* antisense transcript but represses paternal *Ube3a*. *Genomics* **73**: 316-322.
- Chamberlain SJ, Johnstone KA, DuBose AJ, Simon TA, Bartolomei MS, Resnick JL, Brannan CI (2004) Evidence for genetic modifiers of postnatal lethality in PWS-IC deletion mice. *Hum Mol Genet* **13**: 2971-2977.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9578-9582.
- Christian SL, Robinson WP, Huang B, Mutirangura A, Line MR, Nakao M, Surti U, Chakravarti A, Ledbetter DH (1995) Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint regions in both Prader-Willi and Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet* **57**: 40-48.
- Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH (1999) Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* **8**: 1025-1037.
- Conroy JM, Grebe TA, Becker LA, Tsuchiya K, Nicholls RD, Buiting K, Horsthemke B, Cassidy SB, Schwartz S (1997) Balanced translocation 46,XY,t(2;15)(q37.2;q11.2) associated with atypical Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **61**: 388-394.
- Cook T, Gebelein B, Mesa K, Mladek A, Urrutia R (1998) Molecular cloning and characterization of *TIEG2* reveals a new subfamily of transforming growth factor-beta-inducible Sp1-like zinc finger-encoding genes involved in the regulation of cell growth. *J Biol Chem* **273**: 25929-25936.
- Cook T, Gebelein B, Belal M, Mesa K, Urrutia R (1999) Three conserved transcriptional repressor domains are a defining feature of the TIEG subfamily of Sp1-like zinc finger proteins. *J Biol Chem* **274**: 29500-29504.
- Cotter PD, Kaffe S, McCurdy LD, Jhaveri M, Willner JP, Hirschhorn K (1997) Paternal uniparental disomy for chromosome 14: a case report and review. *Am J Med Genet* **70**: 74-79.
- DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A (1991) Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **64**: 849-859.

- DeLorey TM, Handforth A, Anagnostaras SG, Homanics GE, Minassian BA, Asatourian A, Fanselow MS, Delgado-Escueta A, Ellison GD, Olsen RW (1998) Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *J Neurosci* **18**: 8505-8514.
- Dittrich B, Buiting K, Korn B, Rickard S, Buxton J, Saitoh S, Nicholls RD, Poustka A, Winterpacht A, Zabel B, Horsthemke B (1996) Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the *SNRPN* gene. *Nat Genet* **14**: 163-170.
- Eiholzer U, l'Allemand D, van der Sluis I, Steinert H, Gasser T, Ellis K (2000) Body composition abnormalities in children with Prader-Willi syndrome and long-term effects of growth hormone therapy. *Horm Res* **53**: 200-206.
- El-Maarri O, Buiting K, Peery EG, Kroisel PM, Balaban B, Wagner K, Urman B, Heyd J, Lich C, Brannan CI, Walter J, Horsthemke B (2001) Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat Genet* **27**: 341-344.
- Engel E (1993) Uniparental disomy revisited: the first twelve years. *Am J Med Genet* **46**: 670-674.
- Färber C, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B (1999) The chromosome 15 imprinting centre (IC) region has undergone multiple duplication events and contains an upstream exon of *SNRPN* that is deleted in all Angelman syndrome patients with an IC microdeletion. *Hum Mol Genet* **8**: 337-343.
- Färber C, Gross S, Neesen J, Buiting K, Horsthemke B (2000) Identification of a testis-specific gene (*CI5orf2*) in the Prader-Willi syndrome region on chromosome 15. *Genomics* **65**: 174-183.
- Fautsch MP, Vrabel A, Subramaniam M, Hefferen TE, Spelsberg TC, Wieben ED (1998) TGFbeta-inducible early gene (TIEG) also codes for early growth response alpha (EGRalpha): evidence of multiple transcripts from alternate promoters. *Genomics* **51**: 408-416.
- Fax P, Lipinski KS, Esche H, Brockmann D (2000) cAMP-independent activation of the adenovirus type 12 E2 promoter correlates with the recruitment of CREB-1/ATF-1, E1A(12S), and CBP to the E2-CRE. *J Biol Chem* **275**: 8911-8920.
- Fields S und Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Fried G und Wramsby H (1998) Increase in transforming growth factor beta1 in ovarian follicular fluid following ovarian stimulation and in-vitro fertilization correlates to pregnancy. *Hum Reprod* **13**: 656-659.
- Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R, Selhub J (2002) A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5606-5611.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* **10**: 111-113.

- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T (2003) The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* **278**: 4035-4040.
- Gabriel JM, Merchant M, Ohta T, Ji Y, Caldwell RG, Ramsey MJ, Tucker JD, Longnecker R, Nicholls RD (1999) A transgene insertion creating a heritable chromosome deletion mouse model of Prader-Willi and angelman syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9258-9263.
- Ganot P, Bortolin ML, Kiss T (1997) Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* **89**: 799-809.
- Gardiner-Garden M und Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**: 261-282.
- Gerard M, Hernandez L, Wevrick R, Stewart CL (1999) Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality. *Nat Genet* **23**: 199-202.
- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425.
- Glenn CC, Nicholls RD, Robinson WP, Saitoh S, Niikawa N, Schinzel A, Horsthemke B, Driscoll DJ (1993) Modification of 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients. *Hum Mol Genet* **2**: 1377-1382.
- Gray TA, Saitoh S, Nicholls RD (1999a) An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5616-5621.
- Gray TA, Smithwick MJ, Schaldach MA, Martone DL, Graves JA, McCarrey JR, Nicholls RD (1999b) Concerted regulation and molecular evolution of the duplicated *SNRPN* and *SNRPN* loci. *Nucleic Acids Res* **27**: 4577-4584.
- Hall JG (1990) Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *Am J Hum Genet* **46**: 857-873.
- Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM (2000) CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the *H19/Igf2* locus. *Nature* **405**: 486-489.
- Hata K, Okano M, Lei H, Li E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**: 1983-1993.
- Henry I, Bonaiti-Pellie C, Chehensse V, Beldjord C, Schwartz C, Utermann G, Junien C (1991) Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature* **351**: 665-667.
- Herzing LB, Kim SJ, Cook EH, Jr., Ledbetter DH (2001) The human aminophospholipid-transporting ATPase gene *ATP10C* maps adjacent to *UBE3A* and exhibits similar imprinted expression. *Am J Hum Genet* **68**: 1501-1505.
- Herzing LB, Cook EH, Jr., Ledbetter DH (2002) Allele-specific expression analysis by RNA-FISH demonstrates preferential maternal expression of *UBE3A* and imprint maintenance within 15q11- q13 duplications. *Hum Mol Genet* **11**: 1707-1718.
- Hope IA und Struhl K (1986) Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* **46**: 885-894.

- Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR (2001) Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene. *Cell* **104**: 829-838.
- Howlett SK und Reik W (1991) Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development* **113**: 119-127.
- Ingresso D, Cimmino A, Perna AF, Masella L, De Santo NG, De Bonis ML, Vacca M, D'Esposito M, D'Urso M, Galletti P, Zappia V (2003) Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. *Lancet* **361**: 1693-1699.
- Ingman WV, Robker RL, Woittiez K, Robertson SA (2006) Null mutation in transforming growth factor beta1 disrupts ovarian function and causes oocyte incompetence and early embryo arrest. *Endocrinology* **147**: 835-845.
- Jay P, Rougeulle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei MG, Malzac P, Roeckel N, Taviaux S, Lefranc JL, Cau P, Berta P, Lalande M, Muscatelli F (1997) The human necdin gene, *NDN*, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet* **17**: 357-361.
- Jenuwein T und Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080.
- Ji Y, Walkowicz MJ, Buiting K, Johnson DK, Tarvin RE, Rinchik EM, Horsthemke B, Stubbs L, Nicholls RD (1999) The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader-Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. *Hum Mol Genet* **8**: 533-542.
- Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, Atkins CM, Noebels JL, Eichele G, Sweatt JD, Beaudet AL (1998) Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* **21**: 799-811.
- Johannessen M, Moller S, Hansen T, Moens U, Van Ghelue M (2006) The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell Mol Life Sci* **63**: 268-284.
- Johnsen SA, Subramaniam M, Monroe DG, Janknecht R, Spelsberg TC (2002a) Modulation of transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )/Smad transcriptional responses through targeted degradation of TGF $\beta$ -inducible early gene-1 by human seven in absentia homologue. *J Biol Chem* **277**: 30754-30759.
- Johnsen SA, Subramaniam M, Janknecht R, Spelsberg TC (2002b) TGF $\beta$  inducible early gene enhances TGF $\beta$ /Smad-dependent transcriptional responses. *Oncogene* **21**: 5783-5790.
- Johnsen SA, Subramaniam M, Katagiri T, Janknecht R, Spelsberg TC (2002c) Transcriptional regulation of Smad2 is required for enhancement of TGF $\beta$ /Smad signaling by TGF $\beta$  inducible early gene. *J Cell Biochem* **87**: 233-241.
- Johnston SA, Zavortink MJ, Debouck C, Hopper JE (1986) Functional domains of the yeast regulatory protein GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 6553-6557.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* **19**: 187-191.
- Jong MT, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ, Nicholls RD (1999) A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet* **8**: 783-793.

- Kamel A, Margery V, Norstedt G, Thoren M, Lindgren AC, Bronnegard M, Marcus C (1995) Growth hormone (GH) treatment up-regulates GH receptor mRNA levels in adipocytes from patients with GH deficiency and Prader-Willi syndrome. *Pediatr Res* **38**: 418-421.
- Kanduri C, Pant V, Loukinov D, Pugacheva E, Qi CF, Wolffe A, Ohlsson R, Lobanenko VV (2000) Functional association of CTCF with the insulator upstream of the *H19* gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr Biol* **10**: 853-856.
- Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H (2004) Essential role for *de novo* DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* **429**: 900-903.
- Kantor B, Kaufman Y, Makedonski K, Razin A, Shemer R (2004a) Establishing the epigenetic status of the Prader-Willi/Angelman imprinting center in the gametes and embryo. *Hum Mol Genet* **13**: 2767-2779.
- Kantor B, Makedonski K, Green-Finberg Y, Shemer R, Razin A (2004b) Control elements within the PWS/AS imprinting box and their function in the imprinting process. *Hum Mol Genet* **13**: 751-762.
- Keegan L, Gill G, Ptashne M (1986) Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**: 699-704.
- Kishino T, Lalande M, Wagstaff J (1997) *UBE3A/E6-AP* mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**: 70-73.
- Kishore S und Stamm S (2006) The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science* **311**: 230-232.
- Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Bachellerie JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* **85**: 1077-1088.
- Kitsberg D, Selig S, Brandeis M, Simon I, Keshet I, Driscoll DJ, Nicholls RD, Cedar H (1993) Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature* **364**: 459-463.
- Klenova EM, Morse HC, 3rd, Ohlsson R, Lobanenko VV (2002) The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* **12**: 399-414.
- Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM, Jr., Lalande M, Latt SA (1989) Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* **32**: 285-290.
- Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Glatt K, Graham JM, Jr., Kaplan L, Lalande M (1990) Angelman syndrome: three molecular classes identified with chromosome 15q11q13-specific DNA markers. *Am J Hum Genet* **47**: 149-155.
- Knoll JH, Cheng SD, Lalande M (1994) Allele specificity of DNA replication timing in the Angelman/Prader-Willi syndrome imprinted chromosomal region. *Nat Genet* **6**: 41-46.
- Kotzot D, Schmitt S, Bernasconi F, Robinson WP, Lurie IW, Ilyina H, Mehes K, Hamel BC, Otten BJ, Hergersberg M, et al. (1995) Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet* **4**: 583-587.
- Kotzot D (2004) Maternal uniparental disomy 14 dissection of the phenotype with respect to rare autosomal recessively inherited traits, trisomy mosaicism, and genomic imprinting. *Ann Genet* **47**: 251-260.

- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693-705.
- Kozlov SV, Bogenpohl JW, Howell MP, Wevrick R, Panda S, Hogenesch JB, Muglia LJ, Van Gelder RN, Herzog ED, Stewart CL (2007) The imprinted gene *Magel2* regulates normal circadian output. *Nat Genet* **39**: 1266-1272.
- Kurosawa K, Sasaki H, Sato Y, Yamanaka M, Shimizu M, Ito Y, Okuyama T, Matsuo M, Imaizumi K, Kuroki Y, Nishimura G (2002) Paternal UPD14 is responsible for a distinctive malformation complex. *Am J Med Genet* **110**: 268-272.
- Kuslich CD, Kobori JA, Mohapatra G, Gregorio-King C, Donlon TA (1999) Prader-Willi syndrome is caused by disruption of the *SNRPN* gene. *Am J Hum Genet* **64**: 70-76.
- Kuwano A, Mutirangura A, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Saitoh S, Niikawa N, Ledbetter SA, Greenberg F, Chinault AC, Ledbetter DH (1992) Molecular dissection of the Prader-Willi/Angelman syndrome region (15q11-13) by YAC cloning and FISH analysis. *Hum Mol Genet* **1**: 417-425.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116-120.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Ledbetter DH, Riccardi VM, Airhart SD, Strobel RJ, Keenan BS, Crawford JD (1981) Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med* **304**: 325-329.
- Lee PDK, Brannan CL, Hintz RL, Rosenfeld RG (1987) Growth hormone treatment of short stature in Prader-Willi syndrome. *J Pediatr Endocrinol* **2**: 31-34.
- Lee S, Kozlov S, Hernandez L, Chamberlain SJ, Brannan CI, Stewart CL, Wevrick R (2000) Expression and imprinting of *MAGEL2* suggest a role in Prader-willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. *Hum Mol Genet* **9**: 1813-1819.
- Li E, Beard C, Jaenisch R (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**: 362-365.
- Macalma T, Otte J, Hensler ME, Bockholt SM, Louis HA, Kalff-Suske M, Grzeschik KH, von der Ahe D, Beckerle MC (1996) Molecular characterization of human zyxin. *J Biol Chem* **271**: 31470-31478.
- MacDonald HR und Wevrick R (1997) The *necdin* gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. *Hum Mol Genet* **6**: 1873-1878.
- Malcolm S, Clayton-Smith J, Nichols M, Robb S, Webb T, Armour JA, Jeffreys AJ, Pembrey ME (1991) Uniparental paternal disomy in Angelman's syndrome. *Lancet* **337**: 694-697.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*.
- Mapendano CK, Kishino T, Miyazaki K, Kondo S, Yoshiura K, Hishikawa Y, Koji T, Niikawa N, Ohta T (2006) Expression of the *Snurf-Snrpn* IC transcript in the oocyte and its putative role in the imprinting establishment of the mouse 7C imprinting domain. *J Hum Genet* **51**: 236-243.
- Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan PK, Butler MG, Waller DA, Armour JA, Jeffreys AJ, Ladda RL, Nicholls RD (1992) The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome. Implications for molecular diagnosis. *N Engl J Med* **326**: 1599-1607.

- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL (1997) De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (*UBE3A*) in Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**: 74-77.
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**: 501-502.
- McGrath J und Solter D (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**: 179-183.
- Meguro M, Kashiwagi A, Mitsuya K, Nakao M, Kondo I, Saitoh S, Oshimura M (2001) A novel maternally expressed gene, *ATP10C*, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nat Genet* **28**: 19-20.
- Moore T und Haig D (1991) Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* **7**: 45-49.
- Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**: R47-58.
- Murrell A, Heeson S, Cooper WN, Douglas E, Apostolidou S, Moore GE, Maher ER, Reik W (2004) An association between variants in the *IGF2* gene and Beckwith-Wiedemann syndrome: interaction between genotype and epigenotype. *Hum Mol Genet* **13**: 247-255.
- Muscатели F, Abrous DN, Massacrier A, Boccaccio I, Le Moal M, Cau P, Cremer H (2000) Disruption of the mouse *Necdin* gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **9**: 3101-3110.
- Mutirangura A, Jayakumar A, Sutcliffe JS, Nakao M, McKinney MJ, Buiting K, Horsthemke B, Beaudet AL, Chinault AC, Ledbetter DH (1993) A complete YAC contig of the Prader-Willi/Angelman chromosome region (15q11-q13) and refined localization of the *SNRPN* gene. *Genomics* **18**: 546-552.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-389.
- Nazlican H, Zeschnigk M, Claussen U, Michel S, Boehringer S, Gillessen-Kaesbach G, Buiting K, Horsthemke B (2004) Somatic mosaicism in patients with Angelman syndrome and an imprinting defect. *Hum Mol Genet* **13**: 2547-2555.
- Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalonde M (1989) Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* **342**: 281-285.
- Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B (1998) Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet* **14**: 194-200.
- Nicholls RD (1999) Incriminating gene suspects, Prader-Willi style. *Nat Genet* **23**: 132-134.
- Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenko V (2001) CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet* **17**: 520-527.
- Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD (1999a) Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **64**: 397-413.



- Ohta T, Buiting K, Kokkonen H, McCandless S, Heeger S, Leisti H, Driscoll DJ, Cassidy SB, Horsthemke B, Nicholls RD (1999b) Molecular mechanism of angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *Am J Hum Genet* **64**: 385-396.
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* **10**: 475-478.
- Özcelik T, Leff S, Robinson W, Donlon T, Lalande M, Sanjines E, Schinzel A, Francke U (1992) Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (*SNRPN*), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nat Genet* **2**: 265-269.
- Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, Sanchez-Cespedes M, Herman JG, Esteller M (2002) Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res* **62**: 4519-4524.
- Perk J, Makedonski K, Lande L, Cedar H, Razin A, Shemer R (2002) The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center. *Embo J* **21**: 5807-5814.
- Prader A, Labhart A, Willi H (1956) Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myotonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz Med Wochenschr* **86**: 1260-1261.
- Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R (2006) Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem* **52**: 1276-1283.
- Raca G, Buiting K, Das S (2004) Deletion analysis of the imprinting center region in patients with Angelman syndrome and Prader-Willi syndrome by real-time quantitative PCR. *Genet Test* **8**: 387-394.
- Rainier S, Chai JH, Tokarz D, Nicholls RD, Fink JK (2003) *NIPA1* gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6). *Am J Hum Genet* **73**: 967-971.
- Reed JA, Wilkinson PA, Patel H, Simpson MA, Chatonnet A, Robay D, Patton MA, Crosby AH, Warner TT (2005) A novel *NIPA1* mutation associated with a pure form of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics* **6**: 79-84.
- Reik W (1989) Genomic imprinting and genetic disorders in man. *Trends Genet* **5**: 331-336.
- Reik W und Maher ER (1997) Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* **13**: 330-334.
- Reik W, Dean W, Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**: 1089-1093.
- Reik W und Walter J (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* **2**: 21-32.
- Ren J, Lee S, Pagliardini S, Gerard M, Stewart CL, Greer JJ, Wevrick R (2003) Absence of *Ndn*, encoding the Prader-Willi syndrome-deleted gene *necdin*, results in congenital deficiency of central respiratory drive in neonatal mice. *J Neurosci* **23**: 1569-1573.
- Ritzen ME, Bolme P, Hall K (1992) Endocrine physiology and therapy in Prader-Willi syndrome. *Nato ASI Series (Ed. by S. B. Cassidy) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, Cell Biol* **61**: 154-169.

- Robinson WP (2000) Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays* **22**: 452-459.
- Roth MB, Zahler AM, Stolk JA (1991) A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription. *J Cell Biol* **115**: 587-596.
- Rougeulle C, Glatt H, Lalande M (1997) The Angelman syndrome candidate gene, *UBE3A/E6-AP*, is imprinted in brain. *Nat Genet* **17**: 14-15.
- Rougeulle C, Cardoso C, Fontes M, Colleaux L, Lalande M (1998) An imprinted antisense RNA overlaps *UBE3A* and a second maternally expressed transcript. *Nat Genet* **19**: 15-16.
- Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, Viegas-Pequignot E (1998) Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev* **12**: 2108-2113.
- Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kieffmann M, Horsthemke B, Buiting K (2001) The *IC-SNURF-SNRPN* transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for *UBE3A*. *Hum Mol Genet* **10**: 2687-2700.
- Runte M, Kroisel PM, Gillessen-Kaesbach G, Varon R, Horn D, Cohen MY, Wagstaff J, Horsthemke B, Buiting K (2004) *SNURF-SNRPN* and *UBE3A* transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum Genet* **114**: 553-561.
- Runte M, Varon R, Horn D, Horsthemke B, Buiting K (2005) Exclusion of the C/D box snoRNA gene cluster *HBII-52* from a major role in Prader-Willi syndrome. *Hum Genet* **116**: 228-230.
- Saitoh S, Buiting K, Rogan PK, Buxton JL, Driscoll DJ, Arnemann J, Konig R, Malcolm S, Horsthemke B, Nicholls RD (1996) Minimal definition of the imprinting center and fixation of chromosome 15q11-q13 epigenotype by imprinting mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7811-7815.
- Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**: 81-83.
- Schmauss C, Brines ML, Lerner MR (1992) The gene encoding the small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N is expressed at high levels in neurons. *J Biol Chem* **267**: 8521-8529.
- Schuffenhauer S, Buchholz T, Stengel-Rutkowski S, Buiting K, Schmidt H, Meitinger T (1996) A familial deletion in the Prader-Willi syndrome region including the imprinting control region. *Hum Mutat* **8**: 288-292.
- Schüle B, Albalwi M, Northrop E, Francis DI, Rowell M, Slater HR, Gardner RJ, Francke U (2005) Molecular breakpoint cloning and gene expression studies of a novel translocation t(4;15)(q27;q11.2) associated with Prader-Willi syndrome. *BMC Med Genet* **6**: 18.
- Schulze A, Hansen C, Skakkebaek NE, Brondum-Nielsen K, Ledbeter DH, Tommerup N (1996) Exclusion of *SNRPN* as a major determinant of Prader-Willi syndrome by a translocation breakpoint. *Nat Genet* **12**: 452-454.
- Senkel S, Lucas B, Klein-Hitpass L, Ryffel GU (2005) Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim Biophys Acta* **1731**: 179-190.
- Sham P (1997) Transmission/disequilibrium tests for multiallelic loci. *Am J Hum Genet* **61**: 774-778.

- Shemer R, Hershko AY, Perk J, Mostoslavsky R, Tsuberi B, Cedar H, Buiting K, Razin A (2000) The imprinting box of the Prader-Willi/Angelman syndrome domain. *Nat Genet* **26**: 440-443.
- Simon I, Tenzen T, Reubinoff BE, Hillman D, McCarrey JR, Cedar H (1999) Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature* **401**: 929-932.
- Slatter RE, Elliott M, Welham K, Carrera M, Schofield PN, Barton DE, Maher ER (1994) Mosaic uniparental disomy in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* **31**: 749-753.
- Spielman RS und Ewens WJ (1996) The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* **59**: 983-989.
- Spritz RA, Bailin T, Nicholls RD, Lee ST, Park SK, Mascari MJ, Butler MG (1997) Hypopigmentation in the Prader-Willi syndrome correlates with *P* gene deletion but not with haplotype of the hemizygous *P* allele. *Am J Med Genet* **71**: 57-62.
- Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW (2000) Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the *C677T* polymorphism in the *methylenetetrahydrofolate reductase* gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**: 849-853.
- Subramaniam M, Harris SA, Oursler MJ, Rasmussen K, Riggs BL, Spelsberg TC (1995) Identification of a novel TGF- $\beta$ -regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res* **23**: 4907-4912.
- Subramaniam M, Hefferan TE, Tau K, Peus D, Pittelkow M, Jalal S, Riggs BL, Roche P, Spelsberg TC (1998) Tissue, cell type, and breast cancer stage-specific expression of a TGF-beta inducible early transcription factor gene. *J Cell Biochem* **68**: 226-236.
- Subramaniam M, Gorny G, Johnsen SA, Monroe DG, Evans GL, Fraser DG, Rickard DJ, Rasmussen K, van Deursen JM, Turner RT, Oursler MJ, Spelsberg TC (2005) TIEG1 null mouse-derived osteoblasts are defective in mineralization and in support of osteoclast differentiation in vitro. *Mol Cell Biol* **25**: 1191-1199.
- Sun Y, Nicholls RD, Butler MG, Saitoh S, Hainline BE, Palmer CG (1996) Breakage in the *SNRPN* locus in a balanced 46,XY,t(15;19) Prader-Willi syndrome patient. *Hum Mol Genet* **5**: 517-524.
- Surani MA, Barton SC, Norris ML (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308**: 548-550.
- Sutcliffe JS, Nakao M, Christian S, Orstavik KH, Tommerup N, Ledbetter DH, Beaudet AL (1994) Deletions of a differentially methylated CpG island at the *SNRPN* gene define a putative imprinting control region. *Nat Genet* **8**: 52-58.
- Sutcliffe JS, Jiang YH, Galijaard RJ, Matsuura T, Fang P, Kubota T, Christian SL, Bressler J, Cattanaach B, Ledbetter DH, Beaudet AL (1997) The E6-Ap ubiquitin-protein ligase (*UBE3A*) gene is localized within a narrowed Angelman syndrome critical region. *Genome Res* **7**: 368-377.
- Szabo PE, Tang SH, Silva FJ, Tsark WM, Mann JR (2004) Role of CTCF binding sites in the *Igf2/H19* imprinting control region. *Mol Cell Biol* **24**: 4791-4800.
- Tachibana I, Imoto M, Adjei PN, Gores GJ, Subramaniam M, Spelsberg TC, Urrutia R (1997) Overexpression of the TGF $\beta$ -regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J Clin Invest* **99**: 2365-2374.

- Takai D und Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3740-3745.
- Tanabe A, Kurita M, Oshima K, Osada S, Nishihara T, Imagawa M (2002) Functional analysis of zinc finger proteins that bind to the silencer element in the glutathione transferase P gene. *Biol Pharm Bull* **25**: 970-974.
- Tauber M, Barbeau C, Jouret B, Pienkowski C, Malzac P, Moncla A, Rochiccioli P (2000) Auxological and endocrine evolution of 28 children with Prader-Willi syndrome: effect of GH therapy in 14 children. *Horm Res* **53**: 279-287.
- Temple IK, James RS, Crolla JA, Sitch FL, Jacobs PA, Howell WM, Betts P, Baum JD, Shield JP (1995) An imprinted gene(s) for diabetes? *Nat Genet* **9**: 110-112.
- Tsai TF, Armstrong D, Beaudet AL (1999a) Necdin-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome. *Nat Genet* **22**: 15-16.
- Tsai TF, Jiang YH, Bressler J, Armstrong D, Beaudet AL (1999b) Paternal deletion from *Snrpn* to *Ube3a* in the mouse causes hypotonia, growth retardation and partial lethality and provides evidence for a gene contributing to Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **8**: 1357-1364.
- Uetsuki T, Takagi K, Sugiura H, Yoshikawa K (1996) Structure and expression of the mouse *necdin* gene. Identification of a postmitotic neuron-restrictive core promoter. *J Biol Chem* **271**: 918-924.
- van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ (1998) A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* **62**: 1044-1051.
- Vitali P, Basyuk E, Le Meur E, Bertrand E, Muscatelli F, Cavaille J, Huttenhofer A (2005) ADAR2-mediated editing of RNA substrates in the nucleolus is inhibited by C/D small nucleolar RNAs. *J Cell Biol* **169**: 745-753.
- Vu TH und Hoffman AR (1997) Imprinting of the Angelman syndrome gene, *UBE3A*, is restricted to brain. *Nat Genet* **17**: 12-13.
- Wang Z, Peters B, Klussmann S, Bender H, Herb A, Krieglstein K (2004) Gene structure and evolution of *Tieg3*, a new member of the Tieg family of proteins. *Gene* **325**: 25-34.
- Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P (2003) Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet* **12**: (Review Issue 1) R61-68.
- Wevrick R, Kerns JA, Francke U (1994) Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader-Willi syndrome region. *Hum Mol Genet* **3**: 1877-1882.
- Wey E, Bartholdi D, Riegel M, Nazlican H, Horsthemke B, Schinzel A, Baumer A (2005) Mosaic imprinting defect in a patient with an almost typical expression of the Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* **13**: 273-277.
- Williams CA, Angelman H, Clayton-Smith J, Driscoll DJ, Hendrickson JE, Knoll JH, Magenis RE, Schinzel A, Wagstaff J, Whidden EM, et al. (1995) Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. *Am J Med Genet* **56**: 237-238.
- Wirth J, Back E, Huttenhofer A, Nothwang HG, Lich C, Gross S, Menzel C, Schinzel A, Kioschis P, Tommerup N, Ropers HH, Horsthemke B, Buiting K (2001) A translocation

- breakpoint cluster disrupts the newly defined 3' end of the *SNURF-SNRPN* transcription unit on chromosome 15. *Hum Mol Genet* **10**: 201-210.
- Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA (1998) Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *Faseb J* **12**: 949-957.
- Wood AJ und Oakey RJ (2006) Genomic imprinting in mammals: emerging themes and established theories. *PLoS Genet* **2**: e147.
- Wu MY, Chen KS, Bressler J, Hou A, Tsai TF, Beaudet AL (2006) Mouse imprinting defect mutations that model Angelman syndrome. *Genesis* **44**: 12-22.
- Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Ogawa M, Wagstaff J, Kishino T (2003) Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of *Ube3a*. *Hum Mol Genet* **12**: 837-847.
- Yang T, Adamson TE, Resnick JL, Leff S, Wevrick R, Francke U, Jenkins NA, Copeland NG, Brannan CI (1998) A mouse model for Prader-Willi syndrome imprinting-centre mutations. *Nat Genet* **19**: 25-31.
- Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W (1997a) Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet* **6**: 387-395.
- Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B (1997b) A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the *SNRPN* locus. *Eur J Hum Genet* **5**: 94-98.

## 7. Anhang

### Oligonukleotide (Primer)

Die unterstrichenen Regionen markieren die Erkennungssequenzen für die entsprechenden Restriktionsendonukleasen.

Primer für die Amplifizierung des AS-SRO und für die SNP Genotypisierung von P1, P2, P3, P4, P5 und P6

|      |                       |
|------|-----------------------|
| IC16 | GCTCAAGCCGTGTTTCATTTT |
| MOP3 | TTGGCTTCCTTTATATGAAC  |

Primer für die Amplifizierung des PWS-SRO und für die SNP Genotypisierung von P10

|          |                      |
|----------|----------------------|
| SNRPNi1F | GGTGCAGTGGTAAGGAGAGG |
| SNRPNi1R | AAAGCAGTAGCCCAGTGCAG |

Primer und Sonden für die SNP Genotypisierung von P7, P8 und P9

|           |  |
|-----------|--|
| P7:       |  |
| Primer -F | GTTTTGTTTATTCTTAAGTGTATTTTTTTGTCTTTTCC |
| Primer-R  | GAACACCATCAATAAAAATTAAGAAGCTGGAA       |
| Sonde-VIC | CATTTTCTGTATTTATCC                     |
| Sonde-FAM | ATTTTCTGTGTTTATCC                      |

|           |                          |
|-----------|--------------------------|
| P8:       |                          |
| Primer-F  | ATTGATTGTGGTTATGGCGCATTT |
| Primer-R  | CTCACCCTCAGGTCTTCCTATGT  |
| Sonde-VIC | CCAGCTTTTTTGTACCGC       |
| Sonde-FAM | CAGCTTTTTTCGTACCGC       |

|           |                          |
|-----------|--------------------------|
| P9:       |                          |
| Primer-F  | GGTGGGCATGGCATGGA        |
| Primer-R  | AGCAATCATTTCAGCGTCCCTTAG |
| Sonde-VIC | TCACTCCGGACAGCG          |
| Sonde-FAM | CACTCCAGACAGCG           |

Assay-on-Demand für die Genotypisierung der 677 C>T Mutation im *MTHFR* Gen:

Assay-ID:C\_\_\_1202883\_20 (Applied Biosystems)

Oligonukleotide für die EMSA Experimente

|                 |                                 |
|-----------------|---------------------------------|
| ON-1 sense      | GTTTCTAATTCTCAGGGTTTGGTTTGCGGC  |
| ON-1 antisense  | GCCGCAAACCAAACCTGAGAATTAGAAAC   |
| ON-2 sense      | GGTTTGGTTTGCGGCAGAAGAATCTGCATT  |
| ON-2 antisense  | AATGCAGATTCTTCTGCCGCAAACCAAACC  |
| ON-3 sense      | AGAAGAATCTGCATTTCTGAACAAGTGCCAG |
| ON-3 antisense  | CTGGCACTTGTTTCGAAATGCAGATTCTTCT |
| ON-4 sense      | TCGAACAAGTGCCAGGACTGGTCTGAGGAA  |
| ON-4 antisense  | TTCCTCAGACCAGTCCTGGCACTTGTTCTGA |
| ON-5 sense      | GACTGGTCTGAGGAACACACGTTGAGAGAG  |
| ON-5 antisense  | CTCTCTCAACGTGTGTTCTCAGACCAGTC   |
| ON-6 sense      | CACACGTTGAGAGAGGTGGGATTCGGGTTC  |
| ON-6 antisense  | GAACCCGAATCCCACCTCTCTCAACGTGTG  |
| ON-7 sense      | GTGGGATTCGGGTTCACTAACCTGGGTAG   |
| ON-7 antisense  | CTAACCCAGGTAGTGAACCCGAATCCCAC   |
| ON-8 sense      | ACTAACCTGGGTAGAGAAAATTACAGTAA   |
| ON-8 antisense  | TTACTGTAATTTTCTCTAACCCAGGTAGT   |
| ON-9 sense      | AGAAAATTACAGTAATGTGCCAAATCTGAG  |
| ON-9 antisense  | CTCAGATTTGGCACATTACTGTAATTTTCT  |
| ON-10 sense     | TGTGCCAAATCTGAGGAGGGAGCAGAGCTG  |
| ON-10 antisense | CAGCTCTGCTCCCTCCTCAGATTTGGCACA  |
| ON-11 sense     | GAGGGAGCAGAGCTGAAGCCCAGTTTCAAT  |
| ON-11 antisense | ATTGAAACTGGGCTTCAGCTCTGCTCCCTC  |
| ON-12 sense     | AAGCCCAGTTTCAATATGTGAATGAGTGCT  |
| ON-12 antisense | AGCACTCATTCACATATTGAAACTGGGCTT  |
| ON-13 sense     | ATGTGAATGAGTGCTTTATACACTCAA     |
| ON-13 antisense | TTGAGTGTATAAAGCACTCATTCACAT     |

|                  |                                 |
|------------------|---------------------------------|
| ON-6.1 sense     | CACACGAAAAGAGAGGTGGGATTCGGGTTC  |
| ON-6.1 antisense | GAACCCGAATCCCACCTCTCTTTTCGTGTG  |
| ON-6.2 sense     | CACACGTTGTACGAGGTGGGATTCGGGTTC  |
| ON-6.2 antisense | GAACCCGAATCCCACCTCGTACAACGTGTG  |
| ON-6.3 sense     | CACACGTTGAGAATAGTGGGATTCGGGTTC  |
| ON-6.3 antisense | GAACCCGAATCCCACCTATTCTCAACGTGTG |
| ON-6.4 sense     | CACACGTTGAGAGAGTACGGATTCGGGTTC  |
| ON-6.4 antisense | GAACCCGAATCCGTACTCTCTCAACGTGTG  |
| ON-6.5 sense     | CACACGTTGAGAGAGGTGTTTTTCGGGTTC  |
| ON-6.5 antisense | GAACCCGAAAAACACCTCTCTCAACGTGTG  |
| ON-6.6 sense     | CACACGTTGAGAGAGGTGGGAAACGGGTTC  |
| ON-6.6 antisense | GAACCCGTTTCCCACCTCTCTCAACGTGTG  |

Primer zur Amplifizierung der cDNA von TIEG1 und anschließender Insertion in den Vektor pcDNA3 für die EMSA Experimente

|              |                                  |
|--------------|----------------------------------|
| TIEG1-EMSA-F | <u>CTCGAGATGCTCAACTTCGGTGCC</u>  |
| TIEG1-EMSA-R | <u>TCTAGACGTGTCACTGTGTGGGAGC</u> |

Primer für die Konstrukte für die Luciferase Assays

|                 |                                   |
|-----------------|-----------------------------------|
| TIEG1-F         | ATGCTCAACTTCGGTGCCTCTC            |
| TIEG1-R         | CTGTCACTGTGTGGGAGCAG              |
| AS2'-F          | <u>ACGCGTGTGGGATTCGGGTTC</u>      |
| AS2'-F          | <u>ACGCGTGTTTCTAATTCTCAGGGTT</u>  |
| AS2'-R/AS2-R    | <u>CTCGAGGGTTTGAGTGTATAAAGCAC</u> |
| AS2'ext-R/AS2-R | <u>CTCGAGGAGGCAATTTGGTCCAG</u>    |
| E2-F            | <u>AGATCTCGTAAGGCGTGGGAAT</u>     |
| E2-R            | <u>AAGCTTCCTTGCAGGACGCAG</u>      |
| ACE2-F          | <u>GGTACCCCGGTTTTGATTTGGCC</u>    |
| ACE2-R          | <u>AAGCTTCGTCCCCTGTGAGC</u>       |

Primer zur Amplifizierung der cDNA von TIEG1 und anschließender Insertion in den Vektor pGBKT7 für den Yeast-Two-Hybrid Screen

|             |                                      |
|-------------|--------------------------------------|
| TIEG1-YTH-F | <u>GGAATTCATGCTCAACTTCGGTGCCTCTC</u> |
| TIEG1-YTH-R | <u>CGGGATCCTCACTGTGTGGGAGCAGGG</u>   |



Primer für die Sequenzierung der Klon des Yeast-Two-Hybrid Screens

GAL4 AD                      TACCACTACAATGGATG

Primer für die Amplifizierung der u1B-Region

u1B-RC-bis-F                TTTAGAGAGAGGGTAGGGGGTAGT  
u1B-RC-bis-R                CAACAACAACCAAAAATAACAAAAA

Primer für die Amplifizierung der u1D-Region

u1D-bis-F                    TTGTGTGTTTTTTGTGTAAGTGTAGTT  
u1D-bis-R                    CCAAAAAAATCTAAACTATTAAAC

Primer für die Amplifizierung der Region um die u1D-CfoI-Schnittstelle für die Klonierung

u1D-F1                      GTGAGTAGATATATTGTTAATTATAGG  
u1D-R1                      CCCAATCCTATACCTAAAAAACAACCTCC  
u1D-F2                      GGTTTTATAGTATTAGTGATGG  
u1D-R2                      CCTAAAAAACAACCTCCTACC

Primer für die Amplifizierung der Region um die u1D-CfoI-Schnittstelle für die SNaPshot-Analyse

u1D-CfoI-bis-F              TTGTTGTTGTTATGTTGGTTATTGT  
u1D-CfoI-bis-R              TAAACCCTCTTTACATACCCTTTC

Primer für SNaPshot-Reaktion

u1D-CfoI-SNaPshot-R      CTAACCTCCTACCAACTCTATAAAAC  
u1B-SNaPshot-R            TCAATCATCCCTAAATACCTCCTAC

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mir auf unterschiedliche Weise bei meiner Doktorarbeit geholfen haben. Ich danke insbesondere:

Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke für die Überlassung des sehr interessanten Themas, seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die wertvollen Ideen und Anregungen zum Verlauf der Arbeit. Des Weiteren danke ich ihm dafür, dass er mir die Teilnahme an vielen nationalen und internationalen wissenschaftlichen Tagungen ermöglicht hat.

Frau Dr. Karin Buiting für ihre große Hilfsbereitschaft, für die vielen Ratschläge und Antworten auf meine Fragen und die wissenschaftlichen Diskussionen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und für ihre unendliche Geduld.

Meinen Kolleginnen Stephanie Groß, Christina Lich, Deniz Kanber, Saskia Seland, Melanie Heitmann und Inga Nowak für ihre jederzeit gewährte Unterstützung, technische Hilfe im Laboralltag und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Frank Kaiser für seine vielen guten Ideen und Ratschläge und die wissenschaftlichen Diskussionen.

Herrn Dr. Stefan Böhringer für die mathematischen und statistischen Auswertungen der Ergebnisse.

Allen hier nicht genannten Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für eine schöne Arbeitsatmosphäre, für die gute Zusammenarbeit und für das Interesse an meiner Arbeit.

Meinen Eltern und meiner Oma für ihre immerwährende Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich ausdrücklich bei allen hier nicht namentlich aufgeführten Personen bedanken, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## **Lebenslauf**

|                     |  |
|---------------------|--|
| Name                | <b>Corinna Zogel</b>   |
| Geburtsdatum        | 15.09.1977   |
| Geburtsort          | Mülheim an der Ruhr  |
| Staatsangehörigkeit | deutsch  |
| Schulbildung        | <u>1984 - 1988</u><br><b>Grundschule</b> , Mülheim an der Ruhr<br><u>1988 - 1997</u><br><b>Gymnasium</b> , Mülheim an der Ruhr<br><i>Abschluss: Abitur</i> |
| Studium             | <u>Oktober 1997 – August 2003</u><br><b>Studium der Biologie</b> an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf<br><i>Abschluss: Diplom</i>                  |
| Promotion           | <u>seit Januar 2004</u><br><b>Promotion im Fach Biologie</b> im Institut für Humangenetik,<br>Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen       |

Mülheim an der Ruhr, Dezember 2007

(Corinna Zogel)

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Identifizierung von *Cis*- und *Trans*-Faktoren, die beim Imprinting der Prader-Willi/Angelman-Syndrom-Region eine Rolle spielen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Corinna Zogel befürworte.

Essen, den 6.12.2007

---

Unterschrift des wissenschaftlichen Betreuers  
/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen  
(Prof. Dr. Bernhard Horsthemke)

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 6.12.2007

---

Unterschrift der Doktorandin  
(Corinna Zogel)

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 6.12.2007

---

Unterschrift der Doktorandin  
(Corinna Zogel)